



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง พันธุกรรมของไม้พะยูน *Dalbergia cochinchinensis* Pierre

Genetics of the Thai Rosewood, *Dalbergia cochinchinensis* Pierre

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2553

จำนวน 270,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางนลินี รุ่งเรืองศรี

ผู้ร่วมโครงการ นางทุเรียน ทาเจริญ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

23 กันยายน 2554

คำนิยม (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ในปีงบประมาณ 2553 จาก
สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ขอขอบคุณฝ่ายวิจัยรวมถึงเจ้าหน้าที่ที่คอย
ให้การสนับสนุน บริการและเป็นกำลังใจตลอดทั้งโครงการ

คณะผู้วิจัย

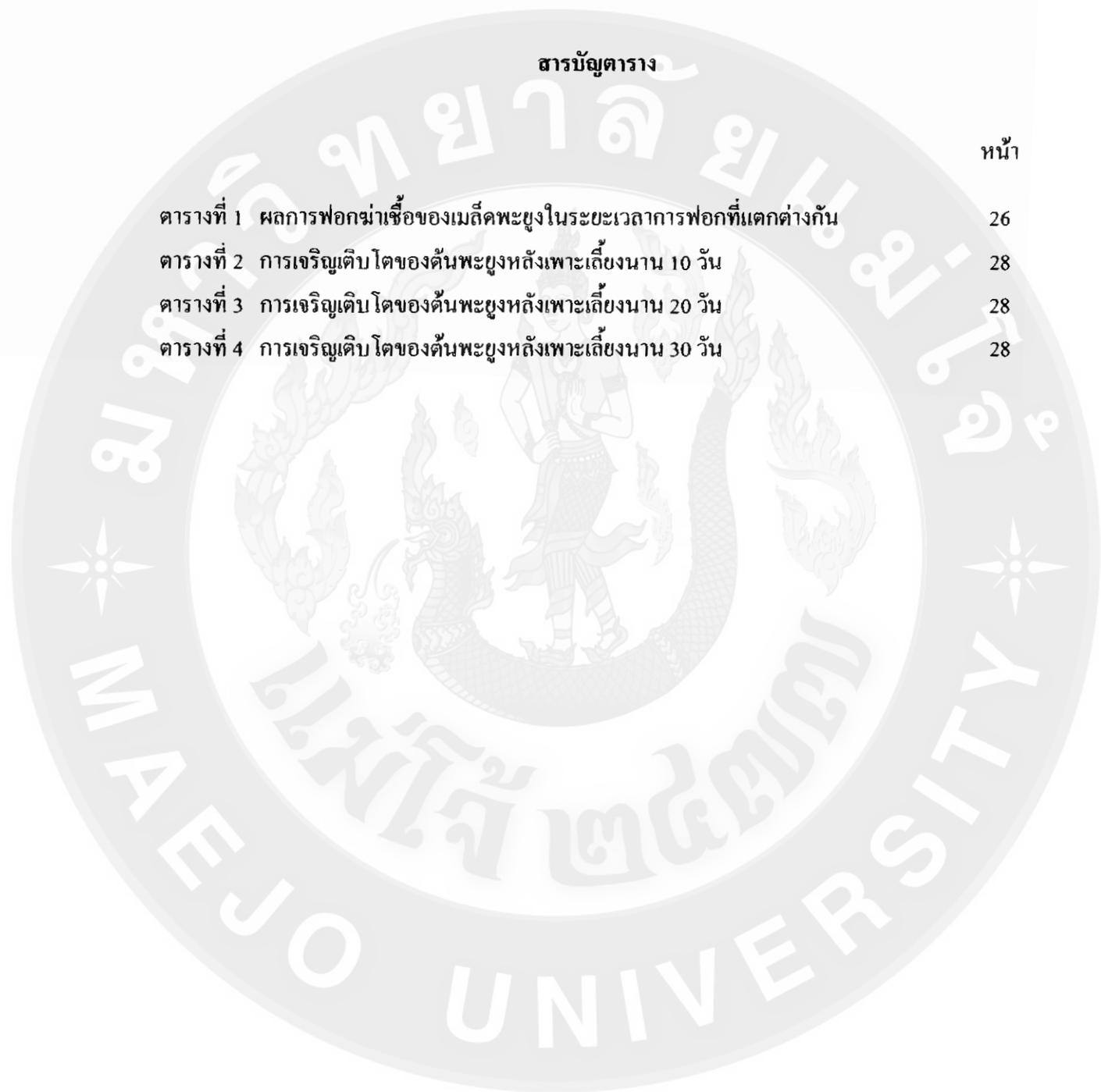


สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์การวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
การตรวจเอกสาร	7
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	11
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	26
สรุปผล	51
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	54

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลการฟอกน้ำเชื้อของเมล็ดพะยูนในระยะเวลาการฟอกที่แตกต่างกัน	26
ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของต้นพะยูนหลังเพาะเลี้ยงนาน 10 วัน	28
ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของต้นพะยูนหลังเพาะเลี้ยงนาน 20 วัน	28
ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตของต้นพะยูนหลังเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน	28



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ต้นไม้พะยูนอายุประมาณ 14 ปี ในบริเวณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่	5
ภาพที่ 2 เนื้อไม้พะยูนสด เนื้อไม้พะยูนแห้ง ปลายไม้พะยูนที่นิยมนำมาเป็นเครื่องใช้	5
ภาพที่ 3 ซ่อใบและดอกจากต้นพะยูน ฝักอ่อนและฝักแก่	6
ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยงพะยูนในหลอดอาหารปลอดเชื้อสูตร Murashige & Skoog (MS)	12
ภาพที่ 5 การชักนำแคลลัสของไม้พะยูนเพื่อทดลองการชักนำให้เป็นต้น	12
ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงเมล็ดและต้นกล้าพะยูนในสูตรอาหาร Murashige & Skoog (MS) และ Woody Plant Media (WPM) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต	13
ภาพที่ 7 ปลายรากงอกจากเมล็ดและยอดอ่อนหรือคาน้ำที่แตกจากข้อของลำต้นมีการแบ่งเซลล์	15
ภาพที่ 8 ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของยีน ribosomal RNA	18
ภาพที่ 9 เปลือกไม้ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอและอุปกรณ์การเก็บตัวอย่าง และฝักพะยูน	20
ภาพที่ 10 ดีเอ็นเอสกัดจากเปลือกไม้สกุลเก็ด (<i>Dalbergia</i>) มักมีสารเจือปน	22
ภาพที่ 11 ไดอะแกรมแสดงบริเวณยีน ribosomal RNA	23
ภาพที่ 12 ต้นพะยูนที่รอดจากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อแล้วย้ายลงปลูกในกระถาง	29
ภาพที่ 13 เซลล์ปลายรากที่มีการแบ่งเซลล์จากเทคนิคการกดและข้อมด้วยสีอาซีโดออร์ซิน	30
ภาพที่ 14 โครโมโซมพะยูนจากปลายราก ข้อมด้วยสีเกียมซา และ DAPI	31
ภาพที่ 15 โครโมโซมพะยูนจากปลายราก ระยะ prometaphase และระยะ metaphase เตรียมด้วย เทคนิค protoplast dropping แล้วข้อมด้วยสี DAPI	32
ภาพที่ 16 คาร์ิโอไทป์ของพะยูน (<i>D. cochinchinensis</i>) $2n = 20$	32
ภาพที่ 17 โครโมโซมไม้พะยูน <i>D. cochinchinensis</i> บางแท่งที่แสดงลักษณะเฉพาะ	32
ภาพที่ 18 โครโมโซมระยะ prometaphase ของไม้พะยูนปรากฏร่องรอยของ NOR	33
ภาพที่ 19 ผลการจับระหว่างโพรบที่มีส่วนของยีน ribosomal RNA กับดีเอ็นเอของไม้พะยูน	34
ภาพที่ 20 ผลการสแกนความถูกต้องแสงของดีเอ็นเอไม้พะยูนและไม้สกุลเก็ด	36
ภาพที่ 21 ผลการประมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อน และเปลือกโดยการหยด	37
ภาพที่ 22 ผลการประมาณความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากฝัก และเปลือก	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 23 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบของไม้สกุลเก็ด	38
ภาพที่ 24 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากฝักสดของเมล็ดพะยูน	38
ภาพที่ 25 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากด้านในของเปลือกลำต้นไม้พะยูน 6 ต้น	39
ภาพที่ 26 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากฝักแห้ง	39
ภาพที่ 27 โคอะแกรมแสดงบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR	40
ภาพที่ 28 ผล ITS-PCR จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเปลือกไม้และใบอ่อนของ ไม้สกุล <i>Dalbergia</i>	40
ภาพที่ 29 Amplified ITS บริเวณ rRNA genes ขนาดประมาณ 750 คู่เบสจากเปลือกไม้สกุลเก็ด	41
ภาพที่ 30 ผลจาก ITS PCR-RFLP ดีเอ็นเอเปลือกต้นไม้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>RsaI</i> และ <i>MspI</i>	42
ภาพที่ 31 ซีนดีเอ็นเอ ITS ของใบอ่อนของไม้สกุลเก็ด 13 ตัวอย่าง	43
ภาพที่ 32 ผล PCR-RFLP จากการย่อยชิ้น ITS ยาว คู่เบสของ 75013 ตัวอย่าง	43
ภาพที่ 33 ผล PCR-RFLP โดยการย่อย ITS ขนาด 750 bp จากใบของไม้พะยูน 8 ตัวอย่าง	44
ภาพที่ 34 ผลจาก RAPD ใบที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5	45
ภาพที่ 35 ผลจาก ใบใช้ไพรเมอร์ OPL5	45
ภาพที่ 36 ผลจาก RAPD ฝักและเปลือกที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5	45
ภาพที่ 37 เปรียบเทียบผลจากการเตรียมดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เจือจาง 1/5 และ 1/50 ในเทคนิค RAPD	46
ภาพที่ 38 ผลจากการทำซ้ำ PCR ใบ ที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5 กับใบอ่อนของพะยูน 6 ต้น	46
ภาพที่ 39 ผลจาก RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5 จากต่างถิ่น	47
ภาพที่ 40 ผลจาก RAPD เปลือกต้นไม้สกุลเก็ด ที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5	47
ภาพที่ 41 ผลจาก PCR ของ chloroplast <i>rbcL</i> gene ไม้พะยูน	48
ภาพที่ 42 ผล PCR-RFLP โดยการย่อย amplified <i>rbcL</i> 1400 bp ด้วยเอนไซม์ <i>Alu I</i>	49
ภาพที่ 43 ผล PCR-RFLP โดยการย่อย amplified <i>rbcL</i> 1400 bp ด้วยเอนไซม์ <i>Rsa I</i> และ <i>Msp I</i>	49

พันธุกรรมของไม้พะยุง *Dalbergia cochinchinensis* Pierre
Genetics of the Thai Rosewood, *Dalbergia cochinchinensis* Pierre

นลินี รุ่งเรืองศรี¹ และ ทูเรียน ทาเจริญ¹

Nalinee Roongruangsree and Turean Tacharoen

¹ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

รายงานการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยุง ซึ่งเป็นไม้ป่าเนื้อแข็งคุณภาพสูงที่มีถิ่นเฉพาะอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านแถบอินโดจีน ผลจากวิธีการทางไซโตเจเนติกส์ชี้ว่าเนื้อเยื่อจากปลายรากและยอดอ่อนของต้นกล้าไม้พะยุงมีจำนวนโครโมโซม $2n=20$ และมีรูปร่างโครโมโซมขนาดเล็ก เทคนิคที่ให้ผลดีคือ การแยกโปรโตพลาสต์แล้วย้อมโครโมโซมด้วยสี Giemsa หรือสีฟลูออเรสเซนต์ DAPI ได้ทดลองวิธีที่ใช้เทคนิค FISH กับโพรบยาวประมาณ 750 คู่เบสที่มีลำดับ ITS (internal transcribed spacers) ซึ่งเป็นส่วนของยีน rRNA เป็นครั้งแรก ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์สามารถจำแนกไม้พะยุงออกจากไม้สกุลใกล้เคียง (*Dalbergia*) ชนิดอื่น โดยวิธี PCR-RFLP ที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *MspI* ตัดบริเวณ ITS การพยายามจำแนกไม้พะยุงโดยเทคนิค RAPD ได้ผลน้อยและไม่คงที่ การวิเคราะห์โดยเทคนิค PCR-RFLP กับส่วนหนึ่ง (1400 คู่เบส) ของยีน *rbcL* ในคลอโรพลาสต์พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่างไม้พะยุงจากต่างถิ่นในภาคอีสาน (จ.อุบลราชธานี จ.สุรินทร์ จ.อุดรธานี) ในการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอสามารถใช้เนื้อเยื่อด้านในจากเปลือกของลำต้นแทนใบได้ แม้จะมีสารเจือปนอยู่บ้าง การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์ไม้ชนิดนี้ไม่ให้สูญพันธุ์คงต้องปรับปรุงวิธีการและอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลอย่างอื่นอีก

คำสำคัญ: โครโมโซมของไม้พะยุง การสกัด DNA ของไม้พะยุง เทคนิค PCR-RFLP และ RAPD

Abstract

Preliminary investigation of genetic diversity of the Thai rosewood (Payoong; *Dalbergia cochinchinensis*) the high-quality hardwood tree geographically distributed only in the Northeast of Thailand and neighboring Indochina was conducted. Cytogenetic techniques revealed the chromosome number of $2n=20$ and a karyotype of small-sized chromosomes (1-10 μm) by protoplast dropping protocol followed by Giemsa and DAPI staining. FISH was attempted with the labeled probe (about 750 bp) obtained from the PCR-amplified ITS of ribosomal RNA genes. PCR-based DNA RFLP analysis using *RsaI* and *MspI* distinguished *D. cochinchinensis* from other *Dalbergia* species. RAPD technique showed a few and inconsistent results with limited random primers. Efforts were made to detect any differences in the PCR-amplified region (1400 bp) of the chloroplast *rbcL* gene by *AluI*, *RsaI*, and *MspI* enzymic digestion. All *Dalbergia cochinchinensis* DNA samples of different provincial origins from the Northeast showed the same fragment patterns. In this study DNA extracted from readily available bark-lining tissues as well as leaves were used in spite of some phenolic compound contaminants. Future studies in search of genetic diversity for conservation of this threatened forest tree would require some technical improvement and more extensive molecular research.

Key words: chromosomes of *Dalbergia cochinchinensis*, DNA extraction, PCR-RFLP and RAPD

คำนำ

พะยุงหรือพุงเป็นไม้เนื้อแข็งที่มีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบอินโดจีนตามลุ่มแม่น้ำโขงเท่านั้น ได้แก่ กัมพูชา ลาว และเวียดนาม ไม้ชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dalbergia cochinchinensis* Pierre อยู่ในอนุวงศ์ Papilionaceae วงศ์ Leguminosea จัดว่าเป็นไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของไทย แม้จะเป็นรองไม้สัก ในตลาดโลกพะยุงมีชื่อทางการค้าว่า Siamese Rosewood หรือ Thailand Rosewood ไม้ชนิดนี้นอกจากจะถือว่าเป็นไม้มงคลแล้วยังมีคุณสมบัติดีกว่าไม้แข็งชนิดอื่น จึงเป็นไม้ที่มีราคาสูงที่สุดในตลาดโลก เนื้อไม้ละเอียด มีสีส้มและลายไม้ที่เป็นเอกลักษณ์และชักเงาได้ดี ไม้ที่แก่จนแห้งจะทนทานต่อพวกแมลงกัดกิน เมื่อแปรรูปแล้วใช้ทำเป็นเครื่องเรือน เครื่องมือเครื่องใช้สิ่งของแกะสลักและเครื่องดนตรีไทยได้อย่างสวยงาม ตั้งแต่สมัยโบราณคนไทยถือว่าเป็นไม้มงคลและไม่นิยมเอามาสร้างบ้าน แต่อาจนำมาทำหิ้งบูชาพระและสิ่งประดิษฐ์ นอกจากคุณค่าทางเศรษฐกิจและสังคมแล้ว ไม้ป่าที่ขึ้นตามธรรมชาติเช่น ไม้พะยุงย่อมมีคุณค่าเชิงนิเวศวิทยา เพราะเป็นไม้ที่ขึ้นเฉพาะภูมิประเทศและภูมิอากาศในแถบลุ่มน้ำโขง มีถิ่นกำเนิดอาศัยอยู่ในสังคมของพรรณพืชที่ได้วิวัฒนาการและปรับตัวมาเป็นเวลานาน นอกจากจะช่วยปกป้องผิวดินแล้วยังรักษาคุณภาพของดินเพราะมีปมรากที่ตรึงไนโตรเจนเช่นเดียวกับพืชอื่นๆ ในวงศ์ Leguminosea แต่มาถึงปีนี้เป็นที่ทราบกันอย่างกว้างขวางว่า ไม้พะยุงของไทยกำลังถูกคุกคามอย่างหนักและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

ข้อมูลจากเอกสารส่งเสริมการปลูกป่าของกรมป่าไม้โดยชัยสิทธิ์ เลียงศิริและคณะ ได้แสดงถึงสถานการณ์ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของไม้พะยุง คือ ในอดีตสถิติปริมาณไม้พะยุงที่นำออกจากป่าในปี พ.ศ. 2530 มีเพียง 662 ลบ.ม. ซึ่งน้อยมากเมื่อเทียบกับไม้สัก (37,278 ลบ.ม.) และไม้ประดู่ (51,937 ลบ.ม.) แต่ปัจจุบันสถานการณ์ได้เปลี่ยนไป เกิดกระแสความต้องการไม้พะยุงทั้งในประเทศและต่างประเทศเพิ่มขึ้นมาก และในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานการลักลอบตัดไม้พะยุง โดยเฉพาะเพื่อการส่งออกและการแปรรูปจนเป็นการค้าอย่างผิดกฎหมาย ปัจจุบันไม้พะยุงในประเทศมีราคาลูกลบค่าขนส่ง 40,000 บาท หากส่งไปขายต่างประเทศมีค่าสูงถึงลูกลบค่าขนส่ง 200,000 บาท คิดเป็นมูลค่าความเสียหายของรัฐปีละ 110,977,339 บาท สำหรับการแก้ไขสถานการณ์การลักลอบตัดไม้พะยุงซึ่งนับวันจะรุนแรงมากขึ้นนี้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้มีแผนการปราบปรามและจับกุมผู้ลักลอบตัดไม้อย่างเร่งรัด

และเร่งดำเนินการผลักดันให้ไม้พะยุงเป็นไม้หวงห้ามเช่นเดียวกับไม้สัก และเตรียมขึ้นบัญชีไม้พะยุงเป็นไม้หายากในบัญชีอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งคุ้มครองชนิดพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์หรือไซเตส (น.ส.พ.ไทยรัฐออนไลน์)

ความสูญเสียไม้พะยุงภายใน 2-3 ปีที่ผ่านมาคำนวณเป็นปริมาณเนื้อไม้มหาศาล ที่เป็นผลจากการบุกรุกตัดฟันไม้จากเขตป่าสงวนและวนอุทยานต่างๆ โดยไม่มีการปลูกทดแทน การทำลายไม้ที่ขึ้นในถิ่นเดิม (*in situ*) อย่างต่อเนื่อง นอกจากเป็นการทำลายระบบนิเวศแล้วยังเป็นการทำลายต้นพันธุ์ที่ดีที่มีอยู่ตามธรรมชาติโดยไม่สามารถเอากินมาได้ ต้นที่มีพันธุกรรมดีสูญไปก่อนที่จะมีโอกาสได้ศึกษาและใช้ประโยชน์ ไม้พะยุงเจริญเติบโตช้าและการศึกษาด้านชีววิทยา โดยเฉพาะ ทางพันธุศาสตร์ในไทยมีน้อยมาก หน่วยงานราชการ คือ กรมป่าไม้ ได้มีการปลูกไว้บ้างสำหรับการศึกษา แต่ยังไม่ได้เริ่มปลูกไม้ชนิดนี้เป็นสวนป่า (*ex situ*) อย่างจริงจัง ในสถานะเช่นนี้ หากยังมีการทำลายไม้พะยุงในธรรมชาติอย่างต่อเนื่องและยังไม่มีการปลูกทดแทน ประเทศไทยอาจต้องสูญเสียทรัพยากรอันมีค่าไปอย่างน่าเสียดาย การอนุรักษ์สายพันธุ์ไม้พะยุงรวมทั้งไม้ประจำถิ่นชนิดอื่นจึงเป็นงานสำคัญเร่งด่วนของกรมป่าไม้ (Sumantakul, 2003)

ในการอนุรักษ์พันธุ์ไม้ชนิดหนึ่งนั้นขั้นตอนแรกที่ต้องทำคือ การศึกษาด้านพันธุกรรม และประเมินระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมในธรรมชาติ ทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร เพื่อจะได้ข้อมูลเกี่ยวกับการวิวัฒนาการของไม้ชนิดนี้ รวมทั้งระบบการผสมพันธุ์ แล้วจึงสามารถนำความรู้นี้ไปวางแผนการจัดการด้านการอนุรักษ์ ทั้งนี้ประชากรในธรรมชาติที่มีเหลืออยู่ให้ศึกษาอาจมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม หรืออาจจะเหมือนกันมากระหว่างประชากรก็ได้ การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง องค์ประกอบทางพันธุกรรมหรือจีโนไทป์ จะนำไปสู่สายพันธุ์นั้นปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศเฉพาะนั้น พรรณไม้อื่นที่ประกอบกันเป็นโครงสร้างของระบบนิเวศจะมีความแตกต่างและเปลี่ยนไปตามสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศ ซึ่งปัจจัยนี้จะเป็นตัวกำหนดให้พืชมีวิวัฒนาการร่วมกันภายในแต่ละสังคม ซึ่งมีความแตกต่างกันไปและส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างถิ่นกำเนิด ในประเทศไทยจะพบไม้พะยุงในป่าเบญจพรรณชื้นและป่าดิบแล้งทั่วไปทางภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 100-200 เมตร ปัญหาในโครงการวิจัยนี้ คือ การค้นหาความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรไม้พะยุงของไทย และวิธีการที่ช่วยจำแนกไม้พะยุงจากต่างท้องถิ่น



ภาพที่ 1 ต้นไม้พะยูนอายุประมาณ 14 ปี ในบริเวณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัด เชียงใหม่



ภาพที่ 2 เนื้อไม้พะยูนสด (a) เนื้อไม้พะยูนแห้ง (b) (bar = 1 μm) ปลายไม้พะยูนที่นิยมนำมาเป็น เครื่องใช้ (c)



ภาพที่ 3 ช่อใบและดอกจากต้นพะยูน (a, b) ฝักอ่อน และฝักแก่ (c, d)

วัตถุประสงค์การวิจัย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยคือ การแสวงหาคำความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรมของ ประชากรไม้พะยูน *Dalbergia cochinchinensis* Pierre ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทย เพื่ออาจใช้ ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป วัตถุประสงค์แบ่งย่อยออกได้ ดังนี้

1. เพื่อจัดหาและเตรียมตัวอย่างไม้พะยูนจากแหล่งต่างๆ ให้ได้วัสดุทดลองเพียงพอ ตั้งแต่การเก็บเมล็ดมาเพาะ การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ และการปลูกต้นกล้าลง กระถาง
2. เพื่อหาวิธีการและเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาโครโมโซมว่ามีจำนวน โครโมโซม $2n = 20$ เหมือนกับ *Dalbergia* ชนิดอื่นหรือไม่ และจัดทำคาริโอไทป์
3. เพื่อหาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อต่างๆ ของไม้พะยูนซึ่งเป็นไม้เนื้อแข็ง เช่น ใบ ฝัก และเปลือกลำต้น เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอคุณภาพเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป
4. เพื่อหาวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างในลำดับเบสของ ribosomal RNA genes บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) ของไม้พะยูนเปรียบเทียบกับไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble) ซึ่งเป็นไม้สกุลเกิดเช่นกัน

5. เพื่อหาวิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากนิวเคลียสโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA by polymerase chain reaction) จากตัวอย่างไม้พะยูนต่างถิ่น

6. เพื่อหาวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างในยีนจากคลอโรพลาสต์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด universal cpDNA primers ของยีน *rbcL* ซึ่งเป็นรหัสของ large subunit of ribulose biphosphate carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

ทั้งนี้การศึกษาระดับดีเอ็นเอพืชมีข้อดีกว่าการใช้สัณฐานวิทยาหรือสรีรวิทยา เพราะลักษณะระดับดีเอ็นเอที่ได้ไม่ขึ้นกับปัจจัยในสภาพแวดล้อมหรือช่วงการเจริญเติบโต ทั้งพันธุกรรมยังเหมือนกันในทุกส่วนประกอบของพืช จึงน่าจะมีประโยชน์ในการศึกษาพันธุกรรมของไม้พะยูนทั้งภายในประชากรเดียวกันและระหว่างประชากร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุศาสตร์ของไม้พะยูน *Dalbergia cochinchinensis* Pierre และวิธีการเบื้องต้นในการศึกษาพันธุกรรมของไม้เนื้อแข็งชนิดนี้ มีประโยชน์สำหรับนักวิชาการที่สนใจและหน่วยราชการ เช่น กรมป่าไม้ นำไปใช้วิจัยในระดับที่สูงขึ้น หากพบว่า ไม้พะยูนของไทยมีความหลากหลายก็ควรเร่งมาตรการอนุรักษ์ยีน (gene conservation) เพื่อใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ต่อไป ทั้งนี้โยบายป่าไม้แห่งชาติได้กำหนดให้มีพื้นที่ป่าเพื่อการอนุรักษ์ 25% และป่าเพื่อเศรษฐกิจ 15% สำหรับการผลิตไม้และของป่า และมีแผนพัฒนาด้านป่าไม้ อันรวมถึงการส่งเสริมการปลูกป่าภาคเอกชน การวิจัยเรื่องไม้พะยูนในมหาวิทยาลัยจึงเป็นการช่วยพัฒนาทรัพยากรป่าไม้ของประเทศ

การตรวจเอกสาร

หนังสือ Plant Resources of South-East Asia 5 (PROSEA) (1) Timber trees: Major commercial timbers (Prawirohatmodjo *et al.*, 1994) กล่าวถึงไม้ในสกุล *Dalbergia* ว่ามีทั้งหมดประมาณ 100 species พบได้ในเขตร้อนบนทุกทวีป มีแหล่งกำเนิดและศูนย์กลางของความหลากหลายอยู่แถบเทือกเขาหิมาลัย มีเพียง 18 species ที่เป็นไม้เนื้อแข็งที่มีค่าทางเศรษฐกิจ ใน

ทวีปเอเชียเองมีอย่างน้อย 7 species ที่เป็น ไม้มีค่าและจัดว่าเป็นไม้ชั้นสูง ส่วนไม้พะยุง *Dalbergia cochinchinensis* พบในประเทศไทยและประเทศอื่นในอินโดจีนเท่านั้น

ข้อมูลทั่วไปและสถิติที่เกี่ยวกับไม้พะยุงในไทยได้เผยแพร่ไว้ในเอกสารส่งเสริมการปลูกป่า กองบำรุง กรมป่าไม้ โดย ชัยสิทธิ์ เลียงศิริ และคณะ ซึ่งแสดงถึงการใช้อย่างจำกัดในอดีตเมื่อเทียบกับไม้สัก แต่ในระยะ 2-3 ปีมานี้มีกระแสข่าวการลักลอบตัดไม้พะยุงและส่งออกอย่างผิดกฎหมายเป็นจำนวนมากจากหน้าหนังสือพิมพ์รายวัน นับตั้งแต่เดือน ค.ศ. 2548 - ก.ย. 2550 ในส่วนเฉพาะของกรมป่าไม้ มีการจับกุมการกระทำผิดแล้วทั้งสิ้น 988 คดี มีผู้ต้องหา 527 ราย ไม้ของกลางที่จับกุมได้ 50,132 ท่อน ขณะที่กรมศุลกากรจับกุมได้ 50,000 กว่าท่อน และมีคดีที่เจ้าหน้าที่ตำรวจฟ้องร้องผู้ลักลอบตัดไม้ราว 1,000 คดี และจากการตรวจสอบพบว่า ผู้ที่อยู่เบื้องหลังส่วนใหญ่เป็นนายทุนจากต่างชาติ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้แถลงข่าวเกี่ยวกับปัญหาการลักลอบตัดแลส่งออกไม้พะยุง พร้อมกับระบุพื้นที่เป้าหมายที่เน้นเฝ้าระวังเป็นพิเศษใน 6 จังหวัด คือ อุบลราชธานี อำนาจเจริญ ยโสธร ศรีสะเกษ สุรินทร์ และมุกดาหาร โดยเฉพาะในอุทยานแห่งชาติ 5 แห่ง ได้แก่ ภูจองนายอย จ.อุบลราชธานี เขาพระวิหาร จ.อุบลราชธานี และศรีสะเกษ ผาแต้ม จ.อุบลราชธานี ภูสระดอกบัว จ.อำนาจเจริญ ยโสธร และมุกดาหาร ภูผายล จ.มุกดาหารกับสกลนคร ป่าสงวนแห่งชาติ 5 แห่ง คือ ดงคำเดียวแปลง จ.อำนาจเจริญ ป่าฝั่งขวาห้วยศาลา จ.ศรีสะเกษ เขาพระวิหาร จ.ศรีสะเกษ ป่าดงปอ จ.ยโสธร ป่าดงบังอี-ดงหัวกอง จ.ยโสธร และอีก 6 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า คือ ห้วยทับทัน-ห้วยสำราญ จ.สุรินทร์ ห้วยศาลา จ.ศรีสะเกษ พนมดงรัก จ.ศรีสะเกษ ภูสีฐาน จ.มุกดาหาร กาฬสินธุ์ อุบลราชธานี ซึ่งเบื้องต้นคาดว่าจะมีไม้พะยุงเหลืออยู่เพียง 300,000 ต้น พร้อมกับประกาศเตรียมมาตรการในการดำเนินการป้องกันและปราบปราม จัดตั้งศูนย์กลางในการแก้ไขปัญหาการลักลอบตัดไม้และค้าไม้พะยุงของภาคอีสาน โดยมีที่ตั้งอยู่ที่สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ 9 (ศรีสะเกษ) จ.ศรีสะเกษ และเตรียมเสนอขอแก้ไขพระราชกฤษฎีกากำหนดไม้หวงห้าม พ.ศ. 2530 ที่แต่เดิมกำหนดให้ไม้พะยุงเป็นไม้หวงห้ามประเภท ก. (ไม้หวงห้ามธรรมดา) ให้เปลี่ยนเป็นไม้หวงห้ามประเภท ข. (ไม้หวงห้ามพิเศษ) และเสนอให้ไม้พะยุงอยู่ในบัญชีแนบท้ายอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าใกล้สูญพันธุ์ (CITES)

สถานการณ์การตัดไม้ทำลายป่าและลักลอบขนไม้เถื่อนในประเทศเพื่อนบ้านเป็นไปในทำนองเดียวกัน รายงานขององค์กร EIA (Environmental Investigation Agency) เดือนมีนาคม

ปี 2008 เรื่อง BORDERLINES: Vietnam's booming furniture industry and timber smuggling in the Mekong region ได้บรรยายถึงเส้นทางการค้าไม้เถื่อนซึ่งรวมไม้พะยูงด้วย จากประเทศลาว ผ่านกัมพูชา ถึงเวียดนามและไทยเพื่อส่งไปยังประเทศอื่นๆ ที่มีความต้องการไม้เนื้อแข็งจากป่าเขตร้อน จึงยิ่งทำให้น่าห่วงใยว่าไม้ป่าบางชนิดเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในไม่ช้า

ในด้านงานวิจัยเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการอนุรักษ์ ได้มีรายงานอย่างต่อเนื่องจากกลุ่มงานวิจัยอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สุจิตรา จางตระกูล (2004) ได้สรุปประโยชน์ของเครื่องหมายโมเลกุลมีในงานอนุรักษ์ไม้ป่าของไทยในตอนหนึ่งว่า สามารถใช้ประเมินระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากร ใช้ประเมินอัตราการผสมข้ามและผสมตัวเอง และการกระจายของยีนในประชากรธรรมชาติ เพื่อนำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ไปพิจารณาว่าประชากรใดควรทำการอนุรักษ์แบบ *ex situ* หรือ *in situ* ซึ่งผลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวได้นำไปใช้ในโครงการอนุรักษ์ไม้สักและไม้สนแล้ว

การวิเคราะห์พันธุกรรมระดับโมเลกุลในปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิด ได้แก่ การศึกษายีนในคลอโรพลาสต์ เช่น ยีน *rbcL* ซึ่งเป็นยีนของ large subunit ของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในพืช ข้อมูลที่ได้จากคลอโรพลาสต์เป็นพันธุกรรมที่ได้จากทางแม่เท่านั้นและได้รับการอนุรักษ์ไว้ในอีโนมพีซอย่างดี จึงมักใช้ในการจำแนกระดับจีโนสและสูงกว่าจีโนส (Clegg, 1993)

เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้มากที่สุดกว่า 10 ปีที่ผ่านมาคือ ลำดับเบส internal transcribed spacers (ITS) ซึ่งมีอยู่ในชุดยีน ribosomal DNA 18S-5.8S-26S ที่เรียงติดกันหลายร้อยชุดบนโครโมโซมเฉพาะบางแห่งในนิวเคลียส ซึ่งสามารถพบได้จากเทคนิคด้าน ไซโตเจเนติกส์ Ribosomal DNA (rDNA) มีหน้าที่สังเคราะห์องค์ประกอบสำคัญของ nucleolar organizer region (NOR) แต่ในกระบวนการระดับโมเลกุลจะใช้มีการติดต่อเป็นบางส่วน ในแง่ทฤษฎีทางวิวัฒนาการลำดับ ITS มีข้อดีคือ ลำดับนี้จะถูกคัดทิ้งโดยไม่ได้นำไปใช้งาน ไม่ได้ถูกคัดค้นในแง่การทำหน้าที่ จึงมีการเก็บรักษาจุดเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในเบสตลอดเวลาที่มีวิวัฒนาการตั้งแต่นั้นมาแล้ว การเปลี่ยนแปลงในอีโนมพีซเป็นผลจากมิวทชัน genetic recombination การผสมข้ามพันธุ์ และยังมีกระบวนการระดับโมเลกุลต่างๆ (unequal crossing-over, gcne conversion ที่อาจเกิดขึ้น

บ่อยๆ) ซึ่งนำไปสู่ concerted evolution นักวิทยาศาสตร์จึงนิยมเปรียบเทียบลำดับเบส ITS เพื่อวัตถุประสงค์ในการบ่งชี้และจำแนกชนิดของพืช ในด้านอนุกรมวิธานและการวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ การใช้ ITS เป็นเครื่องหมายโมเลกุลมีข้อได้เปรียบหลายประการ ลำดับเบส ITS มีความคล้ายกันมากในพืชและเชื้อราหลายชนิด จึงสามารถใช้ universal primers โดยไม่ต้องออกแบบไพรเมอร์ใหม่ จากฐานข้อมูลมหาศาลที่มีรายงานในช่วงสิบกว่าปีนี้พบว่า ลำดับ ITS เรียงถัดกันหลายร้อยชุดบนโครโมโซม ทำให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณในเทคนิค PCR และยังมีขนาดประมาณ 500-700 bp ซึ่งเป็นขนาดที่สั้นดี ภายในแต่ละยีนอมพืชพบว่า ลำดับ ITS ทั้งหมดมีลำดับเบสเหมือนกัน ส่วน ITS ของพืชต่างยีนอมในระดับ genus และ species และต่ำกว่า จะพบ nucleotide polymorphisms เช่น indels ซึ่งสามารถใช้เปรียบเทียบระหว่างยีนอมและนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้ (Álvarez and Wendel, 2003)

การจำแนกพืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมีข้อดีกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพราะไม่ต้องคำนึงถึงอายุของพืชหรือส่วนประกอบของพืชที่นำมาศึกษา ซึ่งฟีโนไทป์ของพืชมักเปลี่ยนแปลงได้ตามอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ทำให้ยากแก่การจำแนกชนิด เครื่องหมายโมเลกุลที่จำแนกพืชในระดับต่ำกว่าสปีชีส์หรือระหว่างต้นในสปีชีส์เดียวกัน(ต่างยีนอไทป์)ได้รับการพัฒนาขึ้นมาหลายแบบ ที่นิยมใช้ได้แก่ เครื่องหมาย RAPD (random amplified polymorphic DNA) ซึ่งสามารถแสดงความแตกต่างในดีเอ็นเอได้หลายจุด (DNA polymorphism) โดยใช้ไพรเมอร์สั้นขนาดสั้น เช่น oligonucleotides 10 เบส ทีละไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR เมื่อทดลองใช้หลายไพรเมอร์ก็อาจจะพบความแตกต่างที่จำเพาะของแต่ละยีนอไทป์หรือที่เรียกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวถ่ายทอดตามหลักเมนเดล การวิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลทางพันธุกรรมระดับ โมเลกุลของพืชนั้นมาก่อน

มีรายงานการใช้เครื่องหมาย isozymes วิเคราะห์ประชากรธรรมชาติของไม้พะยูงในไทยโดย Soonhuae *et al.*(1994) พบว่า ประชากรที่ศึกษามีการแยกกลุ่มค่อนข้างสูง (high population differentiation) อันมีสาเหตุมาจากการมีอยู่อย่างกระจายในพื้นที่ ทำให้เกิด gene flow น้อยและเกิด genetic drift วิธี RAPD-PCR สามารถใช้ตรวจความแตกต่างระหว่างยีนอไทป์ได้ ดังมีรายงานที่ทำการศึกษา *Dalbergia* ชนิดอื่น (นลินี และ อุทัย, 2549), (Hiremath and Nagasampige, 2004), (Juchum *et al.*, 2007)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

พะยูนเป็นไม้เนื้อแข็งที่หายาก โตช้า ความงอกของเมล็ดต่ำและขึ้นตามธรรมชาติในเฉพาะถิ่น คือ แถบอีสานใต้ การขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากการเพิ่มความสามารถในการงอกของเมล็ดแล้ว อาจจะเป็นวิธีหนึ่งที่จะได้วัสดุทดลองเพิ่มขึ้น

การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

เมล็ดไม้พะยูนที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ จากต้นที่ปลูกไว้ภายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ อายุประมาณ 14 ปี ซึ่งแต่เดิมได้เมล็ดมาจากอำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี จากต้นที่เดิมมาจากบ้านดุง จังหวัดอุดรธานี และจากต้นพะยูนที่บ้านป่าบงซึ่งอยู่ด้านหลังมหาวิทยาลัยแม่โจ้ นอกจากนี้ได้ขอความอนุเคราะห์ให้ผู้ที่อยู่ในท้องถิ่นช่วยส่งเมล็ดที่เก็บจากต้นไม้มาให้กับเขตชุมชน ในจังหวัดสุรินทร์และจังหวัดศรีสะเกษ ในช่วงเวลาที่ฝึกแก่ตามฤดูกาล ประมาณเดือนตุลาคมถึงมีนาคม ปีพ.ศ. 2552-2553

ผู้วิจัยไม่สามารถจัดหาเมล็ดจากต้นพะยูนที่ขึ้นอยู่ในป่าตามธรรมชาติได้ จึงได้แต่เมล็ดจากต้นที่ขึ้นอยู่ในบริเวณหมู่บ้านและรอบๆ สถานที่ราชการ เมื่อพบว่าเมล็ดที่ได้รับมีความงอกต่ำ และเกิดการปนเปื้อนด้วยเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก และแม้เมล็ดที่งอกเป็นต้นกล้าอ่อนก็มักจะไม่เจริญเติบโตเป็นต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองเพาะเมล็ดในหลอดอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog) ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพความงอกของเมล็ดและการเจริญ

ในเบื้องต้นทดลองนำเมล็ดมาฆ่าเชื้อโรคและเพาะในอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช BAP (6-benzyl aminopurine) และ NAA (naphthalene acetic acid) เข้มข้นอย่างละ 1 μM แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่มีแค่ BAP จนเจริญเป็นต้นอ่อน คัดแบ่งลำต้นเป็น 3 ส่วน พบว่า ชิ้นส่วนราก ชิ้นส่วนกลาง และชิ้นส่วนยอดสามารถเจริญต่อได้ แต่จะย้ายไปต่อพันธุ์ในอาหารสูตรเดิมได้ 2-3 ครั้งเท่านั้น หลังจากนั้นย้ายต้นอ่อนจากหลอดลงกระถางพบว่ามีดินที่รอดและเจริญต่อในอัตราต่ำ



ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยงพะยุงในหลอดอาหารปลอดเชื้อสูตร Murashige & Skoog (MS)



ภาพที่ 5 การชักนำแคลลัสของไม้พะยุงเพื่อทดลองการชักนำให้เป็นต้น

เมื่อนำชิ้นส่วนของใบจากต้นที่เพาะเลี้ยงในหลอดมาชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหาร MS ที่มี 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) $1 \mu\text{M}$ แล้วย้ายแคลลัสไปเลี้ยงต่อในอาหารสูตรที่มี BAP และ NAA พบว่า แคลลัสบางอันมีการเจริญและพัฒนาเป็นต้นเล็กๆ แต่ไม่เจริญต่อ เมื่อการทดลองเบื้องต้นประสบความสำเร็จน้อย จึงวางแผนการทดลองเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารใหม่ ได้แก่ อาหาร MS อาหาร McCown's WPM และ MS+WPM (1:1) บันทึกจำนวนใบ จำนวนข้อ และความยาวลำต้น

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด

นำเมล็ดพะยุงล้างด้วยน้ำสะอาด แช่ในน้ำร้อนนาน 20 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์นาน 20 นาที ฟอกต่อด้วยสารละลายคลอโรกซ์® 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม Tween 20® 2-3 หยด ระยะเวลาในการฟอกนาน 10 นาทีและ 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง



ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและต้นกล้าพะยูนในสูตรอาหาร Murashige & Skoog (MS) และ Woody Plant Media (WPM) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

การเพาะเนื้อเยื่อ

นำเนื้อเยื่อพะยูน (ต้นพะยูนหลังอาคารศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ดันที่ 3) ที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จำนวน 100 เนื้อเยื่อ นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมีมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อเนื้อเยื่อขยายต้นอ่อนลงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น $0.27 \mu\text{M}$, Biotin $0.27 \mu\text{M}$, Folic acid $2.7 \mu\text{M}$ นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 36 W (Osram cool-white fluorescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมีมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงต้นกล้าพุง

ต้นกล้าพุงอายุ 4 สัปดาห์ย้ายลงบนอาหาร 3 สูตร คือ อาหารสูตร MS, WPM และ MS+PM (1:1) ดัดแปลง ที่เติม BAP 4.43 μM และ NAA 10.74 μM ทั้ง 3 สูตรอาหาร นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 °ซ ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 36 W เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมี 8 ชั่วโมง บันทึกรจำนวนใบ จำนวนข้อและความสูงของต้นพุง ทุก ๆ 10 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) รวมทั้งหมด 3 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 5 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาโครโมโซม

ในเบื้องต้นเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษาโครโมโซมคือปลายรากที่ได้จากการเพาะจากเมล็ด และปลายรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารปลอดเชื้อซึ่งเจริญช้ามาก ใช้เทคนิค squash หรือกดลงบนแผ่น cover slip หลังจากที่ย้อมสีอะซิโตออร์ซิน (aceto-orcein) 2% เพื่อสังเกต ดัชนีการแบ่งเซลล์ และตรวจดูลักษณะของเซลล์และโครโมโซมโดยรวมในกล้องจุลทรรศน์แบบพื้นสว่าง พบว่าไม้พุงมีโครโมโซมขนาดเล็ก เซลล์ในระยะเมทาเฟสมีโครโมโซมแท่งที่ใหญ่ที่สุดขนาดไม่ถึง 10 μm และพบว่าตัวอย่างรากส่วนมากมีดัชนีการแบ่งเซลล์ต่ำ หลังจากนั้นได้เพิ่มทดลองใช้ตัวอย่างปลายรากจากต้นที่ย้ายลงปลูกในกระถาง และปลายยอดและตาจากข้อกิ่งของต้นกล้าที่ปลูกลงกระถาง

การเตรียมเนื้อเยื่อ (pretreatment)

เตรียมเนื้อเยื่อปลายรากที่มีการเจริญและแบ่งเซลล์แบบ ไมโทซิสหรือส่วนปลายเมอริสเต็มด้วยความเย็นจัด และ/หรือ สารละลาย 8-hydroxyquinoline 0.05% (w/v) เพื่อให้เซลล์เข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์พร้อมๆ กัน และอยู่ในระยะเมทาเฟสเพิ่มขึ้น และสายสปินเดิลไม่ทำงาน ทำให้สามารถนับจำนวนและสังเกตรูปร่างโครโมโซมได้ การ pretreat ด้วยความเย็นจัดทำได้โดยเตรียมหลอดพลาสติกที่มีน้ำบรรจุเกือบเต็มเป็นน้ำแข็ง ก่อนใช้ใส่ตัวอย่างจะเติมน้ำเย็นจัดเล็กน้อย แล้วใส่ชิ้นตัวอย่างลงไป ปิดฝาแล้วนำหลอดใส่ในกระติกที่มีน้ำแข็งก้อนอัดแน่น เก็บทั้งกระติกไว้ในตู้เย็นข้ามคืนประมาณ 24 ชม. ถ้า pretreat ด้วยสารละลาย 8-hydroxyquinoline จะแช่ตัวอย่างไว้ที่

อุณหภูมิห้อง 3-5 ชม. ต่อจากนั้นจึงนำรากใส่ในน้ำยาตรึง (ethanol: acetic acid 3 :1) เพื่อรักษาสภาพ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 ชม. เปลี่ยนน้ำยาตรึงใหม่ แล้วเก็บไว้ที่ 4 °ซ หรือ -20 °ซ ก่อนที่จะเตรียมสไลด์โดยเทคนิค squash และการแยกโปรโตพลาสต์เพื่อเตรียมสไลด์แบบผึ่งแห้ง



ภาพที่ 7 ปลายรากออกจากเมสตีคพบการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (ซ้าย) เซลล์เมอริสเต็มบริเวณยอดอ่อนหรือตาที่แตกจากข้อของลำต้นมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (ขวา)

การแยกโปรโตพลาสต์เพื่อศึกษาโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมพืชขนาดเล็กเช่นโครโมโซมไม้พะยูงมีความจำเป็นที่ต้องปรับปรุงเทคนิคเพื่อให้โครโมโซมปรากฏชัดเจนและกระจาย การแยกเอาโปรโตพลาสต์ก่อนแล้วเตรียมสไลด์แบบผึ่งแห้ง (air-dried) จะสามารถเพิ่มคุณภาพของโครโมโซมและสามารถทำคาร์ิโอไทป์ได้ ผู้วิจัยได้ปรับใช้วิธีการของ Doležal *et al.* (1998) และ Ananthawat-Jonsson (2003)

เทคนิคการแยกโปรโตพลาสต์มีขั้นตอน ดังนี้ ตัดรากยาวประมาณ 1 ซม. เก็บไว้ในสารละลายฟอสเฟต (50 mM phosphate buffer pH 7.0) ที่มีสารβ-mercaptoethanol 0.2% เพื่อลดการเปลี่ยนสีของปลายราก (จากปฏิกิริยา oxidation) ข้ายรากลงในสารละลาย pretreatment hydroxyquinoline ที่ 0.05 % แช่ไว้นาน 3 ชม.ถึงข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรึงตัวอย่างรากด้วยน้ำยาตรึงที่มีส่วนผสม ethanol และ acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1 ที่เตรียมใหม่ เก็บที่ 4 °ซข้ามคืน

ล้างตัวอย่างด้วยเอธานอล 70% 2 ครั้ง แล้วเก็บไว้ในเอธานอล 70% ที่ 4 °C ในวิธีการของ Doležel และคณะ (1998) ก่อนจะเตรียมทำสไลด์ แช่รากไว้ในสารละลาย 75 mM KCl + 7.5 mM EDTA, pH 4 หลายๆ ครั้ง คัดปลายรากเป็นชิ้นเล็ก แล้วปล่อยให้ย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ 60 นาที ที่ 30 °C ในสารละลายที่มีเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ (digestion buffer) 400 µl ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ pectinase 1% (v/v) + cellulase 0.5% (w/v) + pectolyase 1% (w/v) ในสารละลาย citrate buffer เข้มข้น 0.1 M กรองเอาโปรโตพลาสต์ด้วยแผ่นกรอง ปั่นเหวี่ยงที่ 1000 RPM เขย่าตะกอนให้โปรโตพลาสต์แขวนลอยอีก (resuspend pellet) ด้วยสารละลาย KCl (75 mM) + EDTA (7.5 mM) ปริมาณ 400 µl แช่ไว้ 5 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงเอาตะกอน แล้วเขย่าให้โปรโตพลาสต์แขวนลอยด้วยเอธานอล 70% เย็นจัด 400 µl แช่ไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำ 1 ครั้ง แล้วเก็บเอาตะกอนมาเขย่าเบาๆ ด้วยเอธานอล 70% เย็นจัด เก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อเตรียมทำสไลด์และย้อมสีต่อไป เวลาเตรียมสไลด์ดูดเอาโปรโตพลาสต์แขวนลอยหยดบนแผ่นสไลด์ รอเกือบแห้งจึงหยดน้ำยาดังที่เย็นจัด เพื่อให้โปรโตพลาสต์แตก จุ่มลงในเอธานอล 100% ผึ่งสไลด์จนแห้ง

วิธีการหยดโปรโตพลาสต์ (protoplast dropping method) ของ Anamthawat-Jonsson (2003) ไม่ใช่สาร pretreat แต่ใช้ความเย็นจัดให้เซลล์เข้าสู่ระยะเมทาเฟสมากขึ้นและชะลออยู่ที่ระยะนี้ มีขั้นตอนดังนี้ เก็บปลายรากใส่หลอดน้ำเย็นจัดและเก็บไว้ในตู้เย็นข้ามคืน เพื่อให้เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวหยุดที่ระยะเมทาเฟส ข้ายรากลงน้ำยาดังที่เตรียมใหม่ ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างครั้งนี้ให้เปลี่ยนน้ำยาดัง 1 ครั้ง เสร็จขั้นตอนนี้แล้วอาจจะเก็บไว้ที่ -20 °C ในการเตรียมสไลด์ข้ายตัวอย่างที่ครั้งแล้วลงเพลทแก้ว ล้างด้วยน้ำกลั่น 30 นาที ระหว่างนี้เปลี่ยนน้ำล้าง 1 ครั้ง คัดรากให้สั้นแล้วผ่าตามความยาวได้กล้องสเตอริโอ เขี่ยเอากลุ่มเซลล์ที่อยู่เหนือ root cap เล็กน้อย แช่ชิ้นตัวอย่าง 2-3 ชิ้นในส่วนผสมเอนไซม์ย่อย (enzyme mix) 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 4 ชม. หรือข้ามคืนที่ 4 °C ในการเตรียมเอนไซม์ล่วงหน้า 10 ml ใช้ cellulase 800-1000 ยูนิต (Sigma C- 1184 from *Aspergillus niger* หรือ Onozuka R10 from Merck #102321) และ pectinase 500 - 650 ยูนิต (Sigma P-5146 หรือ P-4716, from *A. niger*) รวมกันในสารละลาย 0.1 M citrate buffer, pH 4.6 บีบเนื้อเชื้อตัวอย่างในส่วนผสมเอนไซม์ย่อยด้วย micropipette tip แล้วกรองผ่านแผ่นกรองเหล็กขนาด 60 ไมครอนลงไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. เติม สารละลาย hypotonic (75 mM KCl) ที่เย็นจัด 1.5 ml ขยับกรอกเบาๆ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 30 นาที ถ้าโครโมโซมไม่กระจายควรเพิ่มเวลา ปั่นเหวี่ยงที่ 7000 RPM 5 นาที เททิ้งน้ำใส่ส่วนบน เติมน้ำยาดังที่เพิ่งเตรียมและเย็นจัด 1 ml ผสมเบาๆ โดยใช้ปิเปตที่คัดปลาย วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

อย่างน้อย 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 7000 RPM 5 นาที เททิ้งน้ำส่วนบนในหลอดไมโครทิวบ์ ทำซ้ำอีกอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อล้างไซโตพลาสซึมให้สะอาด เติมน้ำยาตรึงเย็นจัด 50 μ l และผสมเบาๆ ด้วย micropipette tip เดิม ถ้าตัวอย่างขุ่นมากอาจเติมน้ำยาตรึงอีก หยดโปรโตพลาสต์บนสไลด์สะอาดที่เปียกน้ำและเย็นจัด หยดห่างจากสไลด์อย่างน้อย 20 ซม. เมื่อสไลด์เกือบแห้ง จุ่มลงอัลกอฮอล์สัมบูรณ์เพื่อกำจัดน้ำ แล้วผึ่งให้แห้ง

การย้อมสีสไลด์ (slide staining)

ย้อมสีสไลด์ที่ตากแห้งแล้ว โดยใช้สีเกียมซา (Giemsa) 10 % ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate ที่ pH 6.9 ในขวด Coplin jar เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างสไลด์ในบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำ 1 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้ง หรือ ย้อมด้วยสารสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorochrome) DAPI โดยหยดสารละลาย DAPI 100 μ l บนสไลด์แล้วปิดด้วยโคเวอร์กลาส เตรียมสีย้อม DAPI (4,6-diamidino-2-phenylidole) โดยเตรียมสารละลายสต็อก (stock solution) 100 μ g/ml ในน้ำ เมื่อจะใช้ เจือจางให้เป็น 1 μ g/ml ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine's citrate ที่ pH 7 (Singh, 1993)

ตรวจหาโครโมโซมโดยกล้องจุลทรรศน์พื้นสว่างภายหลังการย้อมสีเกียมซา เพื่อศึกษาจำนวนและรูปร่างของโครโมโซม การนับจำนวนโครโมโซมยืนยันได้โดย DAPI ที่ย้อมติดดีเอ็นเอเฉพาะในกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Olympus รุ่น BH 50) บันทึกภาพโดยกล้องดิจิทัล (Moticam 2000, China Group) ที่มีโปรแกรมบันทึก Motic Image Plus 2.0 หรือบันทึกภาพด้วยฟิล์ม Kodak 200 จากกล้องถ่ายรูปของกล้อง Olympus ถ้าเป็นภาพพื้นสว่าง

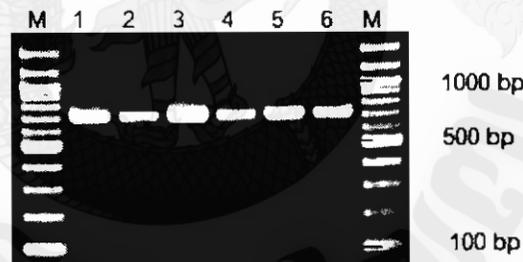
การใช้เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization หรือเรียกอย่างย่อว่า FISH เป็นความก้าวหน้าด้านไซโตเจเนติกส์ระดับโมเลกุล ซึ่งอาจช่วยตรวจพบความแตกต่างทางพันธุกรรมในลำดับเบสที่สนใจได้ เครื่องหมายโมเลกุลบางชนิดสามารถใช้จำแนกชนิดพืชได้ ในกรณีของงานวิจัยนี้ลำดับเป้าหมาย คือ ลำดับเบส ITS ใน ribosomal DNA บนโครโมโซมเฉพาะของไม้พะยุง

การใช้เทคนิค FISH มี 3 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การติดฉลากโพรบ (probe labeling) (2) การเตรียมสไลด์ที่มีโปรโตพลาสต์และโครโมโซมของไม้พะยุง (3) การทำให้โพรบจับกับลำดับเบสจำเพาะบนโครโมโซม (*in situ* hybridization) (Anamthawat-Jonsson, 2001)

ติดฉลากกรดนิวคลีอิกด้วย ULYSIS[®] labeling kit (Molecular Probes) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ซึ่งเป็นวิธีติดฉลากแบบไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzymatic) แต่เป็นปฏิกิริยาเคมี

ระหว่างกรดนิวคลีอิกตรงจุดที่มีเบสเพียวรีนกับสารย้อมเรืองแสง (fluorochrome) ชนิด platinum dye complex ซึ่งทำพันธะถาวรเป็น adduct กับตำแหน่ง N₇ ของ guanine และ adenine เตรียมตัวอย่าง DNA ตกตะกอน 1 µg DNA (ITS-PCR products ขนาด 750 คู่เบสที่เตรียมเอง คุณภาพที่ 8) โดยเติม สาร sodium acetate เข้มข้น 3M ที่ pH 5.2 ในปริมาณ 1/10 ของปริมาตรทั้งหมดที่มีในหลอดไมโครทิวบ์ แล้วเติมเอทานอลสัมบูรณ์ 2 เท่าของปริมาตรที่ได้ แช่แข็งที่ -20 °ซ 30 นาที ปั่นเหวี่ยง 15 นาที ที่ 12,000 RPM ล้างตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ labeling buffer 20 µl ที่มากับผลิตภัณฑ์ ทำตัวอย่างให้เสียสภาพ (denature) ที่ 95 °ซ นาน 5 นาที (ช่วยให้ดีเอ็นเอติดฉลากดีขึ้น) แล้วรีบจุ่มลงในน้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยงสั้นๆ เพื่อให้ตัวอย่างลงที่ก้นหลอด เติมสารสี Alex Fluor 488 1.0 µl ในหลอดของดีเอ็นเอ เติม labeling buffer ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 µl บ่มหลอดปฏิกิริยาที่ 80 °ซ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มหลอดลงในน้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยงสั้น ๆ เพื่อให้สารตกลงที่ก้นหลอด แยกดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้วโดย gel filtration spin column ปั่นเหวี่ยงประมาณ 10000 RPM 2 นาที เก็บส่วนที่กรองได้ซึ่งเป็นโพรบที่ติดฉลากแล้ว (labeled DNA probe) ที่ -20 °ซ จนกว่าจะใช้งาน



ภาพที่ 8 ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS (internal transcribed spacers) ของยีน ribosomal RNA ได้ PCR product ขนาด 750 คู่เบสจากแม่พิมพ์ที่สกัดจากใบของไม้พะยุงจากอ. โขงเจียม จ. อุบลราชธานี (1, 2) อ. บัวเขต จ. สุรินทร์ (3) บ้านบัวขุนจง จ. สุรินทร์ (4, 5) และ ห้วยโจ้ ป่าบ้านโปง (6) ซึ่งนำไปติดฉลากและใช้เป็นโพรบในเทคนิค FISH

การเตรียมสไลด์ตัวอย่างสำหรับเทคนิค FISH มีหลายขั้นตอน (Anamthawat-Jonsson, 2001) หลังจากที่ได้เตรียมสไลด์ที่มีโปรโตพลาสต์และโครโมโซมคั้งที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนี้ ขจัดน้ำ (dehydrate) จากตัวอย่างบนสไลด์ ด้วยเอทานอล 96 % ใน Coplin jar นาน 10 นาที ผึ่งสไลด์แห้งตามด้วย RNase treatment 5 µg/ml ที่ 37 °ซ 1 ชม. เพื่อย่อยสลาย RNA ล้างสไลด์ 2 ครั้ง ด้วย 2x SSC (saline sodium citrate solution) 37 °ซ 5 นาที ขึ้นต่อไปคือการย่อยสลายโปรตีนด้วย

เอนไซม์ (proteinase K treatment) โดยจุ่มสไลด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ proteinase K buffer (ประกอบด้วย 20 mM Tris pH 8, 2 mM CaCl₂) ที่ 37 °ซ นาน 5 นาที จุ่มสไลด์ในสารละลายที่มี proteinase K เข้มข้น 4 -19 ug/ml ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 10-20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 50 mM MgCl₂ ที่อุณหภูมิห้อง ล้างสไลด์ 2 ครั้ง ด้วย 2x SSC ครั้งละ 5 นาทีใน Coplin jar ที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์ลงจุ่มในสารละลาย paraformaldehyde treatment 4% ปริมาตร 50 ml ใน Coplin jar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที (เตรียมก่อนใช้ดังนี้ paraformaldehyde 2 g ในน้ำ 40 ml อุณหภูมิ 70 °ซ ปรับ pH 7 - 7.5 โดยหยด 4M NaOH แล้วเติมด้วย phosphate buffered saline หรือ PBS จนถึง 50 ml) ล้างสไลด์ 2 ครั้ง ด้วย 2x SSC ครั้งละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายดึงน้ำออก (dehydration) โดยจุ่มสไลด์ในเอธานอล 70%, 90%, 96% ที่เตรียมใส่ไว้ใน Coplin jar เป็นลำดับ ทำอย่างละ 2 นาที แล้วฝังสไลด์ให้แห้ง

การไฮบริไดซ์ (hybridization) หรือการทำให้โพรบที่ติดฉลากแล้วสามารถจับกับลำดับดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งในที่นี้คือ บริเวณ ITS ของ ribosomal genes มีขั้นตอนในการเตรียมส่วนผสมของโพรบ (probe mixture) ให้ได้ปริมาตร 20 µl ในหลอดไมโครทิวบ์ มีส่วนประกอบดังนี้ formamide 10 µl, น้ำกลั่น 2 µl, dextran sulphate (20%) 4 µl, 20x SSC 2 µl, 10 % SDS 1 µl และโพรบที่ติดฉลากแล้ว (DNA probe) 1 µl รวมเป็น 20 µl ต้มส่วนผสมนี้ 6 นาที แล้วรีบวลงในน้ำแข็ง 5 นาที หยดโพรบบนสไลด์ ปิดด้วย cover slip ปิดให้สนิทด้วยน้ำยาทาเล็บ ตามด้วยขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพเป็นเส้นเดี่ยว (denaturation) จัดวางสไลด์ในเครื่อง thermal cycler (MJ Research, PTC-200 DNA Engine) ที่ได้ตั้งโปรแกรม denaturation 89 °ซ เป็นเวลา 25 นาที ทำการไฮบริไดซ์ (hybridization) โดยบ่มสไลด์ในกล่องพลาสติกที่บุด้วยกระดาษชื้นและปิดสนิท (humid chamber) ที่ 37 °ซ ข้ามคืน แล้วทำการล้างสไลด์ โดยจุ่มใน 2x SSC อุณหภูมิ (37 °ซ) เป็นเวลาสั้นๆ เช็เอา cover glass ออก แล้วจุ่มใน 0.1x SSC 60 °ซ, 5 นาที 3 ครั้ง ข้ายสไลด์ลง 2x SSC ที่อุณหภูมิ 37 °ซ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 4x SSC-Tween ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หยดสารละลายสีที่เป็น counter stain คือ DAPI 13 µl รอข้าม 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ฝังสไลด์ให้แห้งสักครู่ หยดสาร antifade เล็กน้อยแล้วครอบสไลด์ด้วย cover slip ไล่ฟองอากาศ เก็บสไลด์ในที่มืดและเย็น ส่งในกล่องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (Olympus BH 50) บันทึกภาพด้วยอุปกรณ์ถ่ายภาพดิจิทัล (DP20, Olympus)

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

ในการเก็บตัวอย่างใบหรือยอดอ่อนจากไม้ป่ามาใช้เพื่อการสกัดเอาสารพันธุกรรมนั้น มักมีปัญหา เนื่องจากต้นไม้มักมีขนาดใหญ่โตและสูง หากเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาไม่เหมาะก็มักมีแต่ใบแก่ หรือมีตัวอย่างที่อยู่สูงเกินกว่าที่จะเก็บได้ ในหน้าแล้งก็มักไม่มีตัวอย่างให้เก็บ ภายหลังจึงมีผู้ใช้ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อพืชส่วนอื่น เช่น จากรากตัวอย่างแห้ง ต่อมาก็มีผู้ใช้ตัวอย่างที่เป็นเปลือกไม้มาสกัดเพื่อเอาสารพันธุกรรม (Colpaert *et al.*, 2005; Novaes *et al.*, 2009) ส่วนด้านในของเปลือกไม้ถัดจากเปลือกนอกไปจนถึงเนื้อไม้เป็นส่วนที่ล้าเสี่ยงอาหาร และส่วนแฉกเยื่อที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ ด้านในของเปลือกไม้ยังมีเปลือกนอกปกป้องจากเชื้อโรคหรือสิ่งเจือปน ข้อดีอย่างอื่นของการใช้ส่วนเปลือกนี้ก็คือเก็บตัวอย่างได้ง่ายจากระดับโคนต้น หรือตามบริเวณกิ่ง เครื่องมือที่ใช้ไม่ยุ่งยาก เช่น ใช้มีดถาก ใช้สิ่วสกัด หรือใช้เหล็กเจาะรู (ตุ๊ดตู่) ตอก

การเก็บตัวอย่างจากต้นไม้

เก็บตัวอย่างเปลือกไม้จากต้นไม้ป่าสกุลเกิด ได้แก่ พะยุงจากต้นที่ปลูกในมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ซึ่งเดิมได้นำเมล็ดมาจากจังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดอุดรธานี และปีพอง (*Dalbergia cana*) จากป่าบ้านโป่ง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้ค้อนไม้ตอกเหล็กเจาะรูหรือตุ๊ดตู่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 - 2.5 เซนติเมตร ตามส่วนโคนต้นไม้ หรือตามกิ่งใหญ่ของต้นไม้เหล็กเจาะรู จะตัดส่วนเปลือกไม้พอเข้าถึงส่วนที่เป็นเนื้อไม้ก็จะหยุด เมื่อดึงเหล็กเจาะรูออกตัวอย่างเปลือกไม้จะติดมา ใส่ถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลและเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อจะสกัดดีเอ็นเอจึงนำตัวอย่างแวนเปลือกไม้ออกมาเจือปนเอาส่วนด้านในให้เป็นชิ้นตามขวางอย่าให้หนาเพื่อสะดวกในการบด โดยใช้ตัวอย่างละ 300 มิลลิกรัม เก็บใบจากบางต้นที่สามารถเก็บได้ และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °ซ



ภาพที่ 9 เปลือกไม้ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอและอุปกรณ์การเก็บตัวอย่าง (ซ้าย) ฝักพะยุง (ขวา)

การสกัดสารพันธุกรรมจากเนื้อเยื่อด้านในของเปลือกไม้และใบจากต้นพะยูน

การสกัดปรับมาจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1987), Colpaert *et al.* (2005) และ Novaes *et al.* (2009) ได้แก่ การบดตัวอย่างเนื้อเยื่อในโกร่งที่เติมสารสกัด modified CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) extraction buffer 1 ml [2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), pH 8.0, PVP 2% และ 2-mercaptoethanol 2%] ขณะบด เติมเอนไซม์ proteinase K (1 mg/mL) 35 μ l และ SDS 20% (w/v) ลงไปอีก 100 μ l บดต่อจนละเอียดและเข้ากันดีก่อนตัดตัวอย่างใส่ลงในหลอดไมโครทิววี่ขนาด 1.5 ml ขยับกรอกให้เข้ากัน ใส่หลอดในเครื่อง heating block ที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 65 °C อุ่นไว้นาน 30 นาที หมั่นกรอกหลอดให้น้ำยาสกัดและเนื้อเยื่อเปลือกพืชสัมผัสกันทั่วถึง เมื่อเย็นลงเติมสาร chloroform/isoamyl-alcohol (24:1) 600 μ l กรอกหลอดไปนานาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 x g นาน 15 นาที แล้วย้ายส่วนน้ำใสด้านบนไปใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย CTAB 10% (w/v) 140 μ l และ 5 M NaCl ปริมาณ 280 μ l กรอกหลอดไปมาเบาๆ จนเข้ากัน เติม chloroform/isoamyl-alcohol (24:1) 600 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงแบบเดิมอีก ค่อยย้ายส่วนน้ำใสหลอดใหม่ เติม isopropanol เย็นจัด ปริมาณเท่ากับส่วนน้ำใสที่ได้ ปล่อยให้ตกตะกอนในตู้เย็น -20 °C นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง หรือปล่อยให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2-3 ครั้งด้วยเอทานอล 70 % เปิดฝาหลอดและวางคว่ำปล่อยให้แอลกอฮอล์ระเหยนาน 15 นาทีที่ 37 °C จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 8 mM NaOH 30 μ l กำจัดอาร์เอ็นเอด้วยการเติม RNase A (10 μ g/ml) หลอดละ 1 μ l และอบหลอดดีเอ็นเอไว้ที่ 37 °C นาน 30 นาที สังเกตว่าดีเอ็นเอที่ได้มักจะอยู่ในของเหลวสีน้ำตาลเข้มเนื่องจากมีสารอินทรีย์ปนอยู่ (ภาพที่ 10) แต่อาจทำให้สารปนลดน้อยลงได้ดังนี้ เติมสาร sodium acetate 0.1 M 200 μ l และ เอทานอล 20 μ l วางหลอดบนน้ำแข็ง นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 14,000 x g นาน 5 นาที ย้ายส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ เติม 3 M sodium acetate หรือ 5 M NaCl 1/10 ของปริมาตรน้ำใส และ isopropanol ในจำนวนเท่ากับปริมาตรของเหลวที่มี ตกตะกอนที่ -20 °C นาน 1 ชั่วโมง หรือปล่อยให้ตกตะกอน 2 ครั้งด้วยเอทานอล 70% จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 8 mM NaOH 30 μ l ตรวจสอบดีเอ็นเอโดย agarose minigel electrophoresis 50 โวลต์ นาน 60 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Perkin-Elmer, lambda25 UV/vis)

การสกัดสารพันธุกรรมจากยอดต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดและฝักพะยูนที่เก็บจากแหล่งเดิมใช้วิธีการเหมือนกัน แต่ตัวอย่างใบจะใช้เพียง 200 mg ต่อการสกัดแต่ละครั้ง ส่วนตัวอย่างฝักใช้ 80 mg ในการสกัดแต่ละครั้ง



ภาพที่ 10 ดีเอ็นเอสกัดจากเปลือกไม้สกุลเก็ด (*Dalbergia*) มักมีสารเจือปน

การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

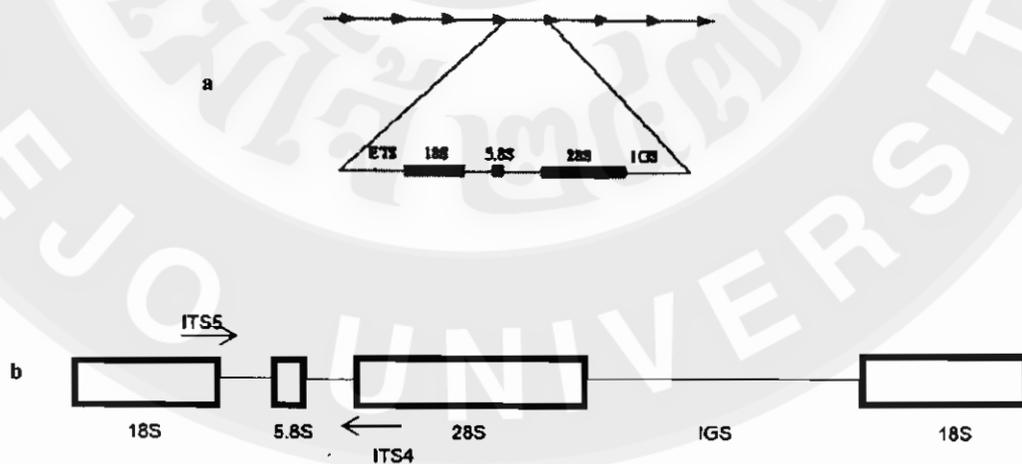
ในเบื้องต้นทำการวัดตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยวิธี optical method โดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Perkin-Elmer, lambda 25 UV/vis) เจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอ 1:100 ด้วย TE buffer ก่อนวัด Absorbance ที่ 260 nm (A_{260}) และที่ 280 nm (A_{280}) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการหาอัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{280} และสังเกตความเข้มข้นระหว่าง 220 nm – มากกว่า 300 nm โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพลาสมิด pET3a บริสุทธิ์ที่แสดง peak สูงสุดความยาวคลื่นแสง 260 nm

การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี optical method แสดงให้เห็นว่าหลายตัวอย่างมีสารอื่นเจือปนในปริมาณสูง จึงทดลองใช้วิธีหดยตัวอย่างที่เจือจางด้วย TE buffer 20 μ l ที่มี ethidium bromide เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (20 μ l) ที่ทราบความเข้มข้น (calf DNA) ที่ 7 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 10 ng (0.5 ng/ μ l), 25 ng (1.25 ng/ μ l), 50 ng (2.5 ng/ μ l), 75 ng (3.75 ng/ μ l), 100 ng (5 ng/ μ l), 200 ng (10 ng/ μ l), 400 ng (20 ng/ μ l) หดยตัวอย่างดีเอ็นเอและดีเอ็นเอมาตรฐานปริมาตร 20 μ l บนแผ่นพลาสติก ส่องดูการเรืองแสงใน UV transilluminator ทั้งนี้เพื่อใช้ประมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่ต้องใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ต่อไป การสกัดดีเอ็นเอโดยเทคนิคที่กล่าวมาแล้วจะห้งตัวอย่างเนื้อเยื่อใบหรือเปลือกหรือฝักในปริมาณต่างกัันดังที่กล่าวมาแล้ว

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

เทคนิค ITS PCR-RFLP หรือการสังเคราะห์บริเวณ ITS (internal transcribed spacers) ของ ribosomal DNA แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจความแตกต่างในจุดตัด (restriction fragment length polymorphism) (Baldwin, 1992; 1993; Chowdappa *et al.*, 2003)

ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ universal primers “ITS5” forward primer 5’GAAGG-TGAAGTCGTAACAAGG3’ และ “ITS4” reverse primer 5’TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’ ซึ่งผลิตผลจากปฏิกิริยานี้จะครอบคลุมลำดับบริเวณ ITS1, 5.8S rDNA, และ ITS2 หลอดปฏิกิริยา PCR ปริมาตรสุดท้าย 50 μ l ประกอบด้วยชุดส่วนผสมจาก Invitrogen ได้แก่ PCR buffer 10x, MgCl₂, Taq 5 U/ μ l 0.3 μ l (1.5 U), dNTP, คู่ Primer ที่สังเคราะห์ “ITS5” และ “ITS 4” อย่างละ 10 pmol, DNA ที่เจือจาง 1:4 ปริมาตร 2 μ l และน้ำกลั่น โดยตั้งอุณหภูมิของรอบปฏิกิริยา 94-55-72 °ซ เป็นเวลา 30-30-60 วินาที ตามลำดับ รวม 55 รอบในเครื่อง thermal cycler (MJ Research, PTC-200 DNA Engine) วิเคราะห์ผล PCR โดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1.2 % agarose ใน TBE buffer) และใช้ ethidium bromide ย้อมดูเจล ทำการตัดย่อย ITS PCR products ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามคำแนะนำของผู้ผลิตเอนไซม์ ได้แก่ *Rsa*, *Msp* I หรือ *Hpa* II (BioLabs) โดยใช้ดีเอ็นเอ 2 μ l และให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ วิเคราะห์ผลการตัดย่อยด้วยเอนไซม์โดยในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (3% agarose ใน TBE buffer) กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 3 ชั่วโมง



ภาพที่ 11 (a) ยีนของ ribosomal RNA อยู่เรียงติดกันหลายหน่วย (tandem repeats) มี intergenic spacer (IGS) กั้นระหว่างหน่วย (b) ส่วนที่วิเคราะห์ ITS (internal transcribed spacers ITS1, 5.8S และ ITS2) โดยใช้ universal primers ITS5 และ ITS4

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอไม้พะยูนแบบสุ่มโดยเทคนิค RAPD

เทคนิค RAPD หรือ random amplified polymorphic DNA ซึ่งใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction สามารถตรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรมใน DNA ในแง่ของการปฏิบัติ ปัญหาของเทคนิคนี้คือความสม่ำเสมอของผลผลิตของปฏิกิริยา จึงจำเป็นต้องหาภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการวิเคราะห์พีชนั้นๆ ตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอ ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ (template) ในแต่ละปฏิกิริยาการสังเคราะห์ จนถึงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาและการอ่านผลได้ด้วยความมั่นใจ

สำหรับการวิเคราะห์ RAPD นลินี และ อุทัย (2549) ได้ดัดแปลงวิธีจาก Williams *et al.* (1990) และ Welsh *et al.* (1995) เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมแก่ไม้เนื้อแข็ง เตรียมส่วนผสมดังนี้ 10X PCR buffer, dNTP ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 mM, MgCl₂ ความเข้มข้นสุดท้าย 3 mM, random primer (Operon Technologies, ชุด OPL) 20 pmol, Taq DNA polymerase (Invitrogen) 1 U, DNA ตัวอย่างซึ่งย่อยด้วย HaeIII แล้ว 1 µl หรือ ตัวอย่างที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ HaeIII แต่เจือจางแล้วอย่างใด, น้ำกลั่นให้ครบ 25 µl ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycler (PTC-200 DNA Engine, MJ Research) 2 โปรแกรม ดังนี้ โปรแกรมที่ 1 เริ่มบ่มที่ 94 °ซ 3 นาทีก่อน ตามด้วยรอบ 94 °ซ 1 นาที, 36 °ซ 1 นาที, 72 °ซ 1: 20 นาที รวม 45 รอบ ต่อด้วย 72 °ซ เป็นเวลา 10 นาที โปรแกรมที่ 2 ตั้งให้เหมือนกับการสังเคราะห์บริเวณ ITS ที่กล่าวมาแล้ว คือ อุณหภูมิ reannealing ขึ้นถึง 55 °ซ และเกิดปฏิกิริยา PCR รวม 55 รอบ

นลินี และ อุทัย (2549) รายงานผล RAPD ของไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble) ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกันว่าปรากฏแถบชัดเจนเมื่อใช้ไพรเมอร์ OPL4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 และ 14 (Kit OPL, Operon) และแม่พิมพ์ดีเอ็นเอจากใบอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการศึกษาครั้งนี้จึงเริ่มจากไพรเมอร์เหมือนกัน คือ OPL-04:GACTGCACAC, OPL-05:ACGCAGGCAC, OPL-06: GAGGG AAGAG, OPL-07:AGGCGGGAAC, OPL-08:AGCAGGTGGA, OPL-10:TGGGAGATGG, OPL-11: ACGATGAGCC, OPL-12: GGGCGGTACT, OPL-14: GTGACAGGCT ทำการตรวจสอบผลจากพีซีอาร์โดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 1.2 % agarose (SeaKem, FMC) ใน Tris-borate buffer (TBE) กระแสไฟ 100 โวลท์ นาน 90 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 1 µg/ml

การศึกษายีนจากคลอโรพลาสต์ไม้พะยูนโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP

ข้อมูลจากการศึกษายีนจากคลอโรพลาสต์เป็นข้อมูลพันธุกรรมจากทางแม่เท่านั้น จึงเชื่อว่ามีความหลากหลายทางอนุกรมวิธานมากกว่า และอาจใช้จำแนกพืชในระดับที่สูงกว่าจีนัสได้ ข้อดีคือเป็นผลจากยีนหลักที่ทราบหน้าที่การทำงานสำคัญ และในปัจจุบันมีผู้ผลิต universal cpDNA primers ของหลายยีนตำแหน่ง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษายีนจากคลอโรพลาสต์ คือ ยีน *rbcL* ซึ่งเป็นรหัสของการสังเคราะห์หน่วยใหญ่ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (photosynthesis) ชื่อว่า large subunit of ribulose biphosphate carboxylase โดยใช้ไพรเมอร์คู่ในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ RBCL5 5' TgTCACCACAAACAgAgACT 3' และ RBCL3 5'TTCCATACT TCACAAgC AgC 3' (Genset Oligos) หลังจากนั้นตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือเทคนิค PCR-RFLP ดังที่กล่าวมาแล้ว

ตัวอย่างที่ใช้มาจากต่างถิ่น ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดอุดรธานี ดีเอ็นเอแม่พิมพ์สกัดจากใบที่เหี่ยวแล้ว (1: 4 และ 1: 19) จากต้นพะยูนในบริเวณมหาวิทยาลัยหรือต้นที่ปลูกขึ้นในกระถาง 11 ตัวอย่าง ดีเอ็นเอจากผัก 2 ตัวอย่างจากจังหวัดศรีสะเกษ จากเปลือกปีพอง และจากใบชิงชัน รวม 15 ตัวอย่าง เตรียมปฏิกิริยาโดยใช้ Master Mix (Promega GoTaq® Green) 25 µl, *rbcL* forward primer และ reverse primer อย่างละ 10 pmol, DNA template 1 µl และ น้ำกลั่น รวมปริมาตรสุดท้าย 50 µl ใช้โปรแกรม PCR เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ ITS ของ ribosomal DNA โดยตั้งอุณหภูมิของรอบปฏิกิริยา 94-55-72 °ซ เป็นเวลา 30-30-60 วินาที ตามลำดับ รวม 55 รอบ ในเครื่อง thermal cycler (MJ Research, PTC-200 DNA Engine) วิเคราะห์ผล PCR โดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1.2 % agarose ใน TBE buffer) และใช้ ethidium bromide ย้อมดูเจล แล้วทำการตัดย่อย ITS PCR products ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามคำแนะนำของผู้ผลิตเอนไซม์ (BioLabs) ได้แก่ *Alu* I, *Rsa* I, *Msp* I หรือ *Hpa* II โดยใช้ดีเอ็นเอ 2 µl และให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ วิเคราะห์ผลการตัดย่อยด้วยเอนไซม์โดยในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (3% agarose ใน TBE buffer) กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 3 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย ethidium bromide แล้วบันทึกภาพ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูนจำเป็นต้องเริ่มจากการศึกษาหาข้อมูลขั้นพื้นฐานและการเตรียมตัวอย่างให้พอกับงานทดลอง แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดและอุปสรรคหลายประการในตัวอย่างเมล็ดที่ได้จากท้องถิ่นในภาคอีสาน จึงได้ทดลองวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การฟอกฆ่าเชื้อ

เมล็ดพะยูน (ต้นพะยูนหลังดึกไบโอเทค ดันที่ 3) เมื่อฟอกด้วยสารละลายคลอโรกซ์® 10 เปอร์เซ็นต์ที่ผสม Tween 20® 2-3 หยดในการฟอกนาน 10 นาทีและ 20 นาที พบว่าที่ระยะเวลาในการฟอกนาน 20 นาที สามารถฟอกเมล็ดปลอดเชื้อได้ 21 เมล็ด จากเมล็ดพะยูน 24 เมล็ด เท่ากับ 87.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อของเมล็ดพะยูนในระยะเวลาการฟอกที่แตกต่างกัน

ระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ (นาที)	จำนวนเมล็ดที่ ฟอกฆ่าเชื้อ	จำนวนเมล็ดที่ ปลอดเชื้อ
10	24	0
20	24	21

การงอกของเมล็ดพะยูน

หลังเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดพะยูน (ต้นพะยูนหลังดึกไบโอเทค ดันที่ 3) เมล็ดงอก 33 เมล็ด จาก 100 เมล็ด จากนั้นจึงย้ายต้นกล้าลงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.27 μM , Biotin 0.27 μM , Folic acid 2.7 μM เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้าพะยูนมีการเจริญเติบโตได้ดี มียอดและรากที่สมบูรณ์

การเพาะเลี้ยงต้นกล้าพะยูน

หลังเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ย้ายต้นกล้าพะยูนลงบนอาหารสูตร MS, WPM และ MS:WPM (1:1) ดัดแปลง ที่เติม BAP ความเข้มข้น 4.43 μM และ NAA 10.74 μM บันทึกจำนวนใบ ข้อและความสูงทุกๆ 10 วัน พบว่าต้นพะยูนมีการเจริญเติบโตดังนี้

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของต้นพะยูนหลังเพาะเลี้ยงนาน 10 วัน

การเจริญเติบโต	ชนิดของสูตรอาหาร		
	MS	WPM	MS+WPM
จำนวนใบ	2.0 ^a	2.2 ^a	2.0 ^a
จำนวนข้อ	1.4 ^a	1.6 ^a	1.4 ^a
ความสูง	4.6 ^a	4.7 ^a	5.1 ^a

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของต้นพะยูนหลังเพาะเลี้ยงนาน 20 วัน

การเจริญเติบโต	ชนิดของสูตรอาหาร		
	MS	WPM	MS+WPM
จำนวนใบ	3.8 ^a	3.8 ^a	4.0 ^a
จำนวนข้อ	3.0 ^a	3.4 ^a	3.8 ^a
ความสูง	5.8 ^a	6.7 ^a	7.2 ^a

ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตของต้นพะยูนหลังเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน

การเจริญเติบโต	ชนิดของสูตรอาหาร		
	MS	WPM	MS+WPM
จำนวนใบ	4.6 ^a	4.0 ^a	4.4 ^a
จำนวนข้อ	3.6 ^a	3.8 ^a	4.4 ^a
ความสูง	6.9 ^a	7.3 ^a	8.3 ^a



ภาพที่ 12 ต้นพะยูนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อแล้วย้ายลงปลูกในกระถาง

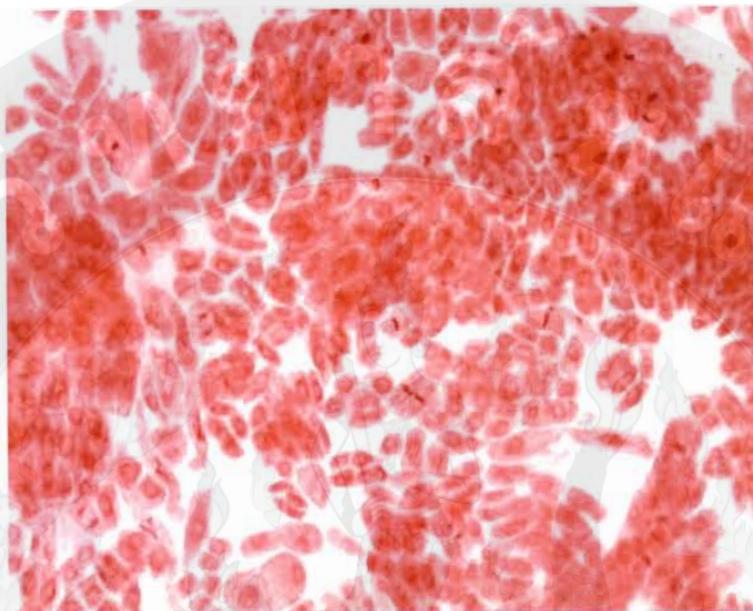
สรุปได้ว่า การทดลองเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงต้นกล้าไม้พะยูนในสภาพปลอดเชื้อด้วยสูตรอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ อาหาร MS อาหาร McCown's WPM และ MS+WPM (1:1) โดยบันทึกจำนวนใบ จำนวนข้อ และความยาวลำต้น ให้ผลซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อนำต้นกล้าย้ายลงกระถางแม้จะอยู่รอดในอัตราต่ำ แต่ก็สามารถใช้ใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอในการศึกษาขั้นต่อไป

ดังนั้นการขยายพันธุ์ไม้พะยูนโดยวิธีเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้ตั้งแต่การเพาะเมล็ดที่เก็บจากต้นจนถึงต้นอ่อน ใบอ่อนของไม้พะยูนที่ได้จากสภาพปลอดเชื่อน่าจะเหมาะสมสำหรับศึกษาโครโมโซมจากส่วนที่กำลังเจริญและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพราะไม่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนด้วยเชื้อโรคโดยเฉพาะเชื้อรา ซึ่งเป็นปัญหาของตัวอย่างใบที่เก็บจากต้นตามธรรมชาติที่เป็นใบแก่อยู่บนต้นไม้สูงและมีเชื้อโรคปนอยู่

การศึกษาโครโมโซม

การเตรียมตัวอย่างราก และ pretreatment

เมื่อนำรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดแก้วซึ่งน่าจะได้น้ำเนื้อเยื่อที่เหมาะสมมาก คือเป็นรากที่สะอาด root cap ไม่หนาและรากมีขนาดเล็ก เหมาะที่จะตัดแยกเอา undifferentiated cells ไปศึกษาโครโมโซมเบื้องต้นโดยวิธี squash ที่ใช้สีย้อมอะซีโตออร์ซิน ปรากฏว่ามีดัชนีการแบ่งเซลล์ต่ำ แสดงว่าเซลล์ที่ปลายรากจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำและช้า จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาโครโมโซม การศึกษาโครโมโซมส่วนใหญ่ที่สำเร็จครั้งนี้ได้จากปลายรากที่งอกใหม่จากการเพาะเมล็ด ซึ่งเป็นเมล็ดที่เก็บใหม่จากต้นพะยูนที่ปลูกในบริเวณมหาวิทยาลัย



ภาพที่ 13 เซลล์ปลายรากที่มีการแบ่งเซลล์จากเทคนิคการกดและย้อมด้วยสีอาซีโตออร์ซิน

การเตรียมสไลด์และการย้อมสี

การใช้เทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์ (protoplast dropping) (Anamthawat-Jonsson (2003) และย้อมด้วยสีเกียมซา (Giemsa) พบว่า จำนวนโครโมโซมของไม้พะยูน *Dalbergia cochinchinensis* มี $2n = 20$ หรือ มีโครโมโซม 10 คู่ ภาพที่ 14 เช่นเดียวกับไม้สกุลใกล้เคียงอื่น คือ *D. latifolia* Roxb. และ *D. sissoo* Roxb. (Indian rosewood) ต่างมี $x = 10$ หรือ $2n = 20$ (PROSEA 5 (1): 155) โครโมโซมไม้พะยูนมีขนาดเล็ก ประกอบด้วยโครโมโซมรูปร่างต่างๆกัน มีทั้ง metacentric, submetacentric, acrocentric และ telocentric แต่โครโมโซมคู่เล็กมากจะจำแนกและจับคู่ไม่ได้ การใช้เทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์และย้อมด้วยสี fluorochrome- DAPI ช่วยยืนยันจำนวนและรูปร่างโครโมโซมได้ดี เนื่องจาก DAPI เป็นสารที่จับกับบริเวณ A-T rich ในดีเอ็นเออย่างเฉพาะ ในกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์มีสมบัติเรืองแสงสีฟ้า (Excitation 340-380 nm, Emission 430 nm) เมื่อย้อมสไลด์จะเห็นโครโมโซมเป็นจุดๆ สีฟ้าภายในเซลล์ ทำให้นับจำนวนโครโมโซมได้ดังภาพที่ 15

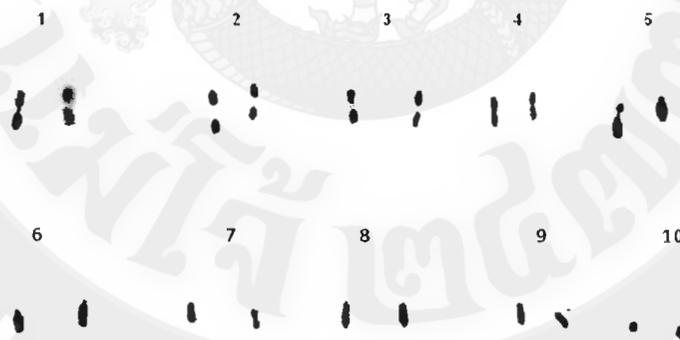


ภาพที่ 14 โครโมโซมพะยุงจากปลายราก ระยะ prometaphase (a) และ ระยะ metaphase (b) และ (c) เตรียมด้วยเทคนิค protoplast dropping ข้อมด้วยสีเกียมซา โครโมโซมใน (c) มีสภาพพองกว่าปกติเนื่องจาก hypotonic pretreatment เป็นเวลานาน และถูกข้อมด้วย DAPI มาก่อน



ภาพที่ 15 โครโมโซมพะยูนจากปลายราก ระยะ prometaphase (ซ้าย) และระยะ metaphase (ขวา) เตรียมด้วยเทคนิค protoplast dropping แล้วย้อมด้วยสี DAPI, Bar 10 μm

คาริโอไทป์เบื้องต้นได้จากจากระยะเมทาเฟสที่พบในจำนวนน้อย แต่พอสรุปได้ว่าในจำนวนโครโมโซมที่มีอยู่ 10 คู่ นั้น มีชนิด metacentric 4 คู่ เรียงตามขนาด ดังภาพที่ 16 ที่น่าสังเกตคือ คู่ที่ 2 และ 3 มีส่วนของ centromere ยื่นออกเป็น secondary constriction ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 5 มีลักษณะต่างกันภายในคู่เดียวกัน จะพบว่า มีแท่งเดียวที่มี secondary constriction ชัดเจน ซึ่งปรากฏให้เห็นในหลายเซลล์ (chromosome spreads) โครโมโซมขนาดเล็กอีก 5 คู่ นั้น มีทั้ง acrocentric และ metacentric แต่ยากที่จะระบุรูปร่างได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะคู่สุดท้ายที่เล็กที่สุด



ภาพที่ 16 คาริโอไทป์ของพะยูน (*D. cochinchinensis*) $2n = 20$

ภาพที่ 17 โครโมโซมไม้พะยูน *D. cochinchinensis* บางแท่งที่แสดงลักษณะเฉพาะ; Bar 10 μm

เทคนิค molecular cytogenetics

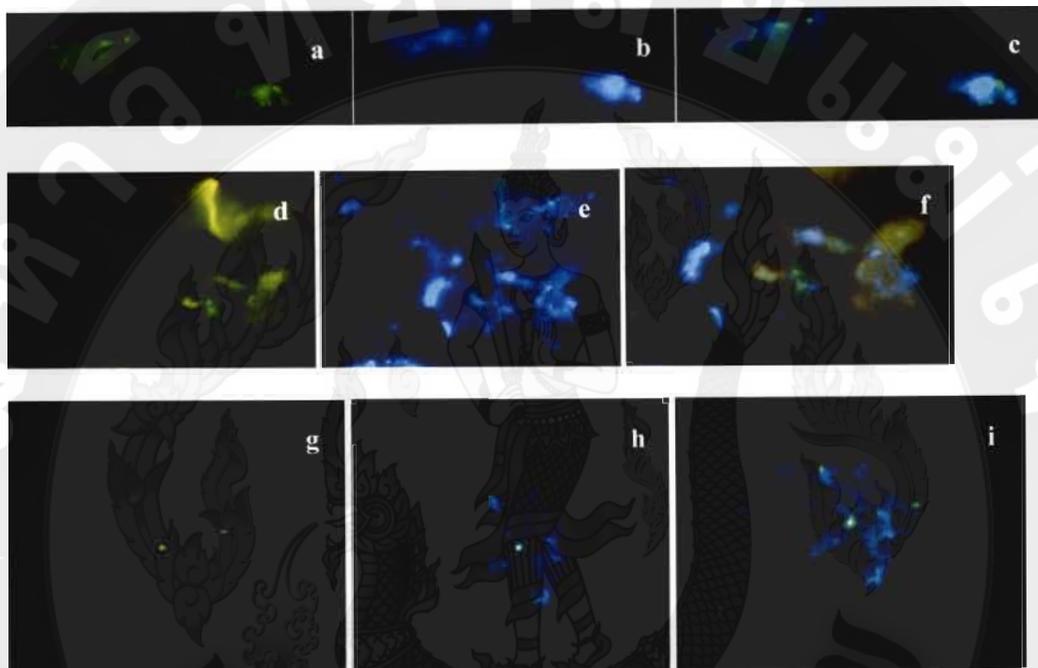
การศึกษาโครโมโซมโดยเทคนิคระดับโมเลกุล fluorescence *in situ* hybridization (FISH) มีประโยชน์ในการวิเคราะห์ตำแหน่งของลำดับเบสเป้าหมายเพื่อค้นหาความแตกต่างระหว่างพืช ซึ่งเป็นการตรวจในระดับที่ละเอียดยิ่งขึ้น เนื่องจาก FISH มีวิธีการซับซ้อน ในเบื้องต้นมักเริ่มด้วยการหาตำแหน่งของยีนที่มีอยู่หลาย copy ซึ่งจัดอยู่ในประเภท functional repetitive DNA และค่อนข้างจะถูกอนุรักษ์ไว้ในกระบวนการวิวัฒนาการในพืชชั้นสูง ได้แก่ กลุ่มยีนของ ribosomal RNA ในการทดลองนี้ได้ใช้ PCR product ของ ส่วน internal transcribed spacers ภายในยีน (ITS) ที่เตรียมเองและทำการติดฉลากโพรบด้วย ULYSIS[®] labeling kit (Molecular Probes) ที่ใช้สารเรืองแสงสังเคราะห์ชนิด Alex Fluor 488 (Emission 510 nm, Excitation 460 – 490 nm) ซึ่งจะให้สัญญาณสีเขียวบนพื้นสีฟ้าเมื่อย้อมซ้ำ (counterstain) ด้วยสาร DAPI ที่จับกับสารพันธุกรรมอย่างจำเพาะ



ภาพที่ 18 โครโมโซมระยะ prophase ของไม้พะยูนย้อมด้วยสีเขียว ปรากฏร่องรอยของ nucleolar organizing region (NOR) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสังเคราะห์ ribosomal RNA

จากการทดลองใช้เทคนิค FISH เป็นครั้งแรกเพื่อหาตำแหน่งของยีน ribosomal RNA บนโครโมโซมของไม้พะยูน พบว่ายังต้องปรับปรุงให้ดีขึ้น ผลปรากฏว่าโพรบที่เป็น ITS-PCR product ที่สังเคราะห์จากแม่พิมพ์ดีเอ็นเอของพะยูนสามารถจับ (hybridize) กับบางส่วนของสารพันธุกรรมของตัวอย่างพะยูนบนสไลด์ได้ ภาพที่ 19 แต่ความยาวของตัวโพรบ 750 คู่เบส ไม่เพียง

พอที่จะแสดงสัญญาณชัดเจน โพรบที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสง Alex Fluor 488 จะให้จุดสีเขียว ส่วนสารพันธุกรรม (โครมาติน และโครโมโซม) จะปรากฏเป็นสีฟ้าจาก counterstain ด้วยสี DAPI



ภาพที่ 19 ผลการไฮบริไดซ์ระหว่างโพรบขนาด 750 คู่เบสที่มีส่วนของยีน ribosomal RNA ติดฉลากด้วยสี Alex Fluor 488 (สีเขียว) กับสารพันธุกรรมระยะต้น prophase ของไม้พะยูน สีย้อมด้วย DAPI รูป a, d, g แสดงสัญญาณจากโพรบสีเขียว รูป b, e, h แสดงสารพันธุกรรม (โครโมโซมหรือโครมาติน) รูป c, f, i เป็นการซ้อนสัญญาณของสารเรืองแสงทั้ง 2 ชนิด

การศึกษาตำแหน่งของ rRNA genes บนโครโมโซมพืชมีอย่างแพร่หลาย โดยมากนักวิจัยจะใช้ universal rDNA probe ที่ครอบคลุม บริเวณ 18S-5.8S-25S ที่ได้จากพลาสมิด pTa71 ของข้าวสาลี ซึ่งยาวถึง 9 kb เช่น ในงานวิจัยไม้เนื้อแข็งของไทย Chokchaichamnankit *et al.* (2008) ใช้โพรบดังกล่าวเพื่อศึกษาไม้สกุลก่อนจากภาคเหนือ สำหรับการศึกษาโครโมโซมไม้พะยูนโดยเทคนิค FISH ที่ต้องปรับปรุงต่อไป นอกจากการใช้โพรบที่ยาวขึ้นแล้วคือขั้นตอน denaturation ที่ต้องทดลองทำที่เวลาต่างๆ กัน การทำ denaturation ที่ 89 °ซ นาน 25 นาทีนั้นอาจนานเกินไปเพราะทำให้โครโมโซมเสียสภาพเป็นส่วนใหญ่ จึงยังไม่สามารถตรวจพบตำแหน่งของยีน ribosomal RNA บนโครโมโซมระยะ prometaphase หรือ metaphase ได้อย่างชัดเจน

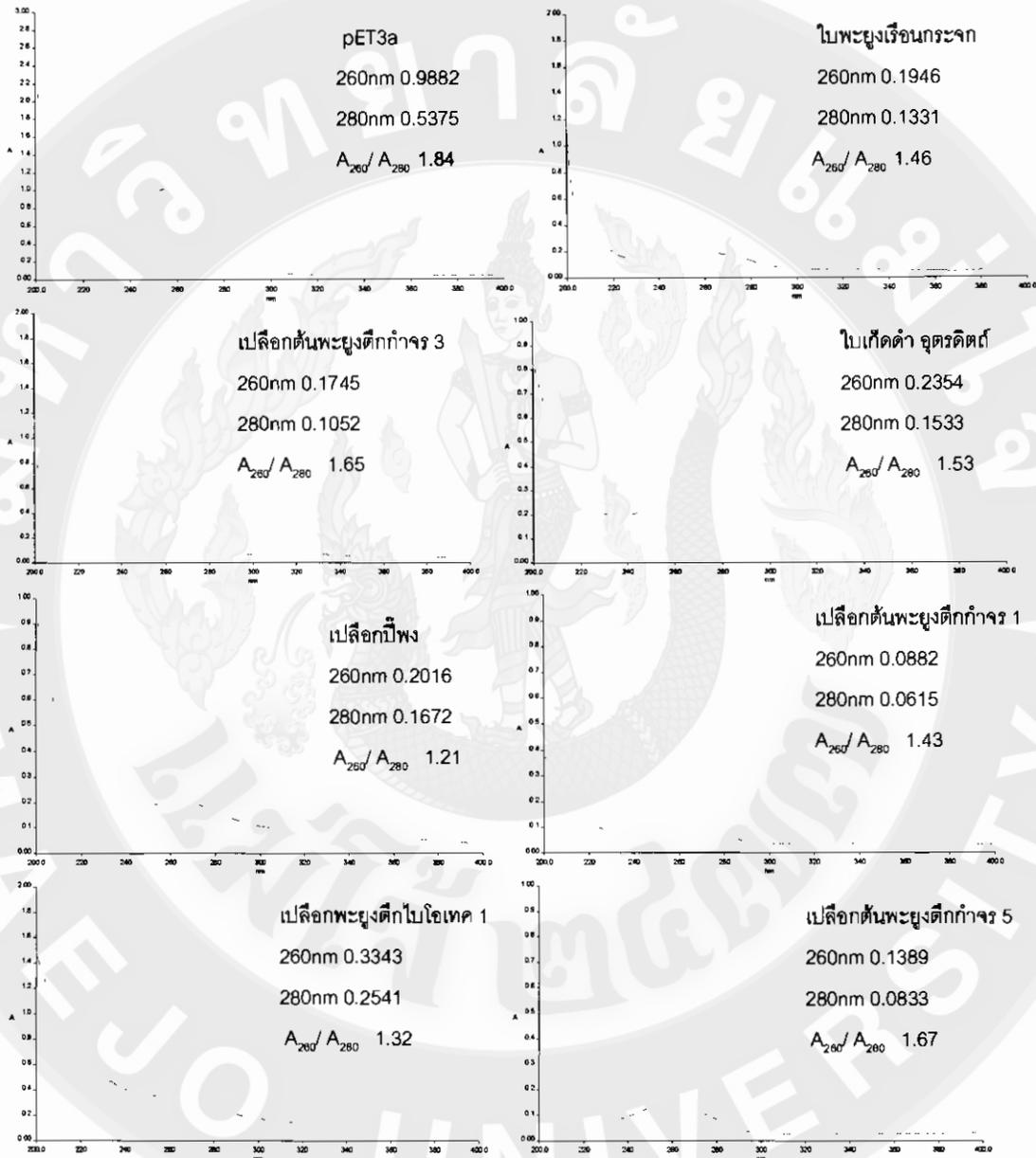
การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อน เปลือกคั้นไม้ และฝัก

ตัวอย่างขอดีอ่อนหรือใบอ่อนจากต้นพะยุงใช้สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้จากวิธีการทั่วไปที่ใช้สาร CTAB แต่เนื่องจากคั้นที่มีอยู่เป็นต้นสูง การเก็บใบอ่อนค่อนข้างลำบาก ส่วนการเพาะเลี้ยงเมล็ดต่างถิ่นในหลอดเพื่อขยายลงกระถางไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากมีเชื้อโรคปนเปื้อนและเมล็ดแก่เกินไป จึงทดลองสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเปลือกของโคนคั้นและจากฝักของเมล็ดจากตัวอย่างที่ได้จากจ.สุรินทร์และจ.ศรีสะเกษ พบว่าตัวอย่างจากเปลือกและฝักจะได้ปริมาณดีเอ็นเอ น้อยกว่าและบริสุทธิ์น้อยกว่า ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งว่ามีสารอินทรีย์ อยู่ในปริมาณค่อนข้างสูงในช่วงคลื่นที่ต่ำกว่า 260 nm ซึ่งน่าจะเป็นสารประเภทฟีนอลิกและ โพลีแซคคาไรด์ และอื่นๆ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอและอัตราส่วน A_{260}/A_{280} บ่งชี้ถึงความไม่บริสุทธิ์ และความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง ผลสแกนของตัวอย่างที่ไม่แสดง peak ที่ 260 nm จะไม่ได้ผลในการทำปฏิกิริยา PCR ดังเช่นดีเอ็นเอจากเปลือกพะยุงคั้นใบโอเทค 1 ในภาพที่ 20

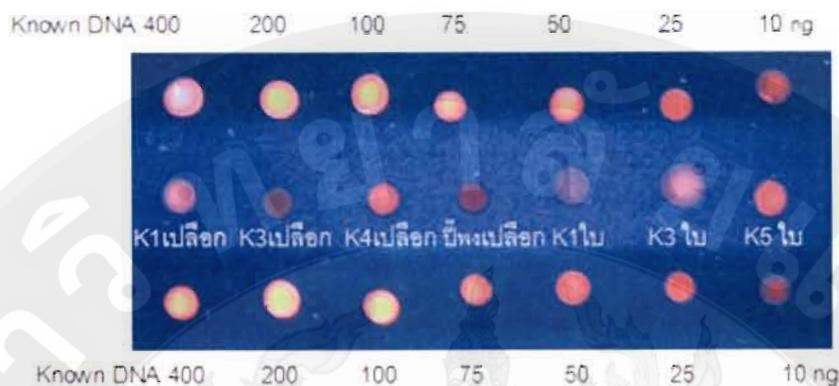
เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 1 μ l ของไม้พะยุงจากต้นที่ปลูกที่หลังดึกกำจรบุญแปง (K) ที่สกัดได้มาทดลองทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ universal ITS primers พบว่า ได้ผลในบางตัวอย่าง เท่านั้นถึงแม้ว่าลำดับเบส ITS มีอยู่หลายชุดในซีโนม จึงสันนิษฐานว่าสารเจือปนน่าจะเป็นอุปสรรค สำคัญในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องพีซีอาร์ จึงนำดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ได้ผลพีซีอาร์มา ประเมินความเข้มข้นโดยวิธีหยดและเปรียบเทียบการเรืองแสงเมื่อถูกส่องด้วยแสง UV ได้ผล ดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่งประมาณความเข้มข้นได้

ตัวอย่าง K1 เปลือก มีดีเอ็นเอเข้มข้น ประมาณ 10 ng (แสดงว่าตัวอย่างที่สกัดได้เดิมมี ดีเอ็นเอ 1 ng/ μ l) ส่วน K1 ใบอ่อนมี เกือบ 10 ng K3 เปลือก มีน้อยกว่า 10 ng และ K3 ใบอ่อน ประมาณ 10 ng คั้น K4 เปลือกมีดีเอ็นเอ ประมาณ 25 ng และ K5 ใบอ่อนมี ประมาณ 25 ng ส่วน เปลือกของไม้สกุลเกตุเป็พจากป่าบ้านโป่งมีดีเอ็นเอ ประมาณ 10 ng พอสรุปว่าในการทำปฏิกิริยา PCR ควรใช้ดีเอ็นเอประมาณ 5-20 ng เป็นแม่พิมพ์

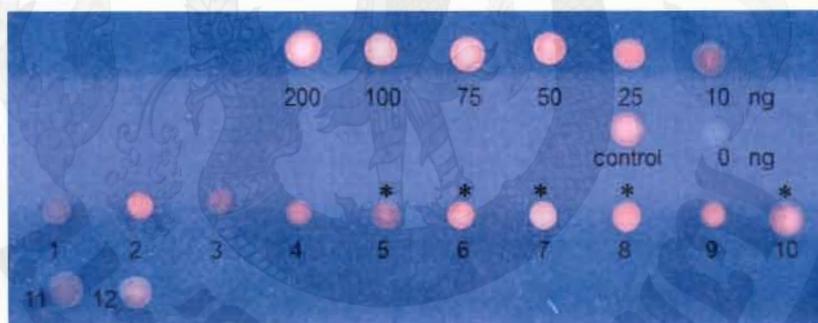
การเตรียมดีเอ็นเอให้ได้คุณภาพเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์น่าจะต้องมีวิธีแยก เอาพวกสารเจือปนออกจากดีเอ็นเอ เช่น คัดเอาส่วนเจลที่มีเฉพาะดีเอ็นเอในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำชิ้นเจลไปสกัดเอาดีเอ็นเอโดย filtration ให้ได้ดีเอ็นเอที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ก่อนที่จะทำ ปฏิกิริยาพีซีอาร์



ภาพที่ 20 ผลการสแกนความดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอจากใบและเปลือกต้นของไม้พะยูนและไม้สกุล
 เก็ดที่เจือจาง 1:100 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของพลาสมิด pET3a ผลสแกนของ
 ดีเอ็นเอจากเปลือกพะยุงตีกใบโอเทค 1 ไม่มี peak ขึ้นที่ 260 nm



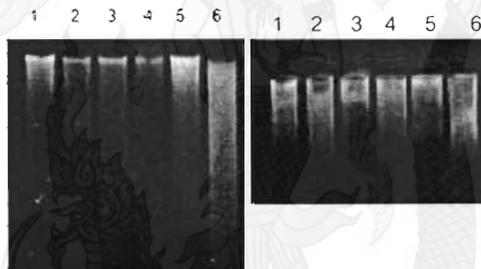
ภาพที่ 21 ผลการประมาณความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อน (shoot) และเปลือก โดยการใช้วิธีที่ได้ออกมาเปรียบเทียบกับสารละลาย ethidium bromide ในอัตราส่วน 1:1 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (calf DNA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (10 - 400 ng)



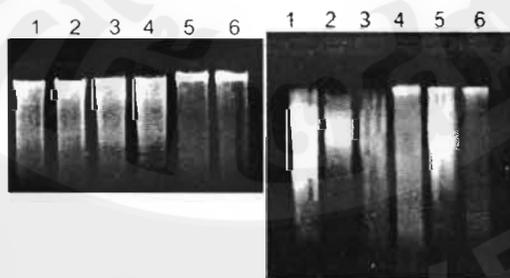
ภาพที่ 22 ผลการประมาณความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากฝัก และเปลือก 12 ตัวอย่าง โดยการใช้วิธีที่ได้ออกมา เหมือนในภาพที่ 21 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (calf DNA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 - 200 ng)

เมื่อนำดีเอ็นเอจากฝักแห้งและเปลือกลำต้น 12 ตัวอย่างมาประมาณความเข้มข้นดังภาพที่ 22 ตัวอย่างมีดังนี้ 1 ฝักจากโรงเรียนบ้านออก จ. สุรินทร์; 2 ฝัก อ.บัวเขต จ. สุรินทร์; 3 ฝักแห้ง อ.โนนเรือ จ.ศรีสะเกษ; 4 ฝักแห้ง อ.บัวชุม จ. สุรินทร์; 5 เปลือกพะยูนหลังตึกใบโอบก ดันที่ 3; 6 เปลือกชิงชัน; 7 เปลือกเกิดแดงหน้าฟาร์มมหาวิทยาลัย; 8 เปลือกเกิดดำตันที่ 1 หัวอ่างห้วยไฉ้; 9 เปลือกเกิดเขาคายเหนืออ่างห้วยไฉ้; 10 เปลือกปีพงป่าบ้านโปง; 11 เปลือกปีห้วยเจ็ดยอด; 12 เปลือกปีเขาคาย แล้วนำดีเอ็นเอไปทดสอบทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มดีเอ็นเอในลำดับเบส ITS ปรากฏว่า ได้ผลเพียง 5 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง 5, 6, 7, 8 และ 10

การสกัดดีเอ็นเอจากไม้เนื้อแข็งโดยวิธีการที่ดัดแปลงในการศึกษาครั้งนี้สามารถสกัดได้จากใบ เนื้อเยื่อจากเปลือกของลำต้น และแม้แต่ฝักแห้งที่เก็บจากต้น เมื่อตรวจดูดีเอ็นเอในอิเล็กโตรโฟรีซิสบางตัวอย่างจะให้ปริมาณที่ได้ผลในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังแสดงในภาพที่ 22 แต่จะพบว่า การทำพีซีอาร์ได้ผลไม่สม่ำเสมอ แม้จะเตรียมแม่พิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีการเจือจางและอุ่นพร้อมเขย่าอย่างดี หรือ การย่อยด้วยเอ็นไซม์ที่เป็น four-base cutter เช่น *HaeIII* ก่อนการทำพีซีอาร์ก็ตาม การที่มีสารเจือปนมากน่าจะเป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ลำดับเบสที่มีอยู่น้อย เช่น ในการทำ RAPD แต่สำหรับการเพิ่มปริมาณลำดับ ITS พบปัญหาน้อยลง ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าเป็นลำดับซ้ำจำนวนหลายชุด (repetitive DNA)



ภาพที่ 23 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบของไม้สกุลเก็ด (ซ้าย) 1 เก็ดแดง, 2 เก็ดดำ, 3 ปี่เขากวาย, 4 ปี่พวง, 5 ปี่หยวก, 6 พะยุงที่ตีกับโอเทคต้นที่ 16 และ (ขวา) ผลการสกัดดีเอ็นเอจากยอดใบของต้นพะยุง 6 ต้นในบริเวณมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ภาพที่ 24 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากฝักสดของเมล็ดพะยุง ต. บัวเขต อ. บัวเขต จ. สุรินทร์ (ซ้าย) 1,2 ต้นที่ 1 จากบ้านบัวขุนจง, 3,4 ต้นที่ 5 จากบ้านบัวขุนจง 5,6 จากต้นในโรงเรียนบ้านออก (ขวา) 1 ต้นที่ 1 ศูนย์ออกกำลังกาย; 2 ต้นที่ 2 อาสาสมัครรักษาดินแดน ; 3 ต้นที่ 3 โรงรถสำนักงานการศึกษาอำเภอเก่า; 4 ต้นที่ 4 ที่สำนักงานเกษตรอำเภอ; 5 ตัวอย่างจากต้นที่ 2 เก็บครั้งที่ 2



ภาพที่ 25 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากด้านในของเปลือกลำต้นไม้พะยุง 6 ต้นที่ปลูกในบริเวณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อายุประมาณ 14 ปี ตัวอย่างปรากฏสารเจือปนสีน้ำตาลในปริมาณไม่เท่ากัน



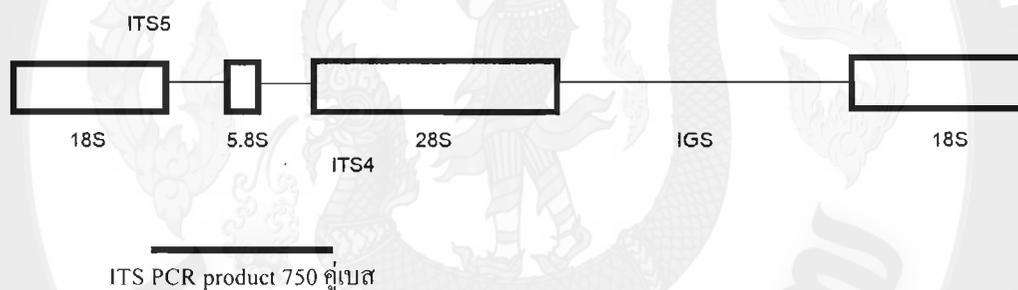
ภาพที่ 26 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากฝักแห้งจากบ้านโนนเรือ จ. ศรีสะเกษ ได้ผลในปริมาณน้อยมาก ช่องเจลที่ 3 และ 4 จากตัวอย่างเดียวกัน

จะสังเกตได้ว่าปริมาณดีเอ็นเอสกัดจากฝักแห้งจะมีปริมาณน้อยและไม่สามารถเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในพีซีอาร์ได้ จึงเป็นปัญหาในการวิเคราะห์ทั้ง ITS, RAPD, และ ยีน *rbcL*

แม้ว่าบางตัวอย่างสกัดแล้วได้ดีเอ็นเอ จึงสันนิษฐานว่ามีสารบางอย่างจับกับดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์: ITS (internal transcribed spacers), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) และยีน *rbcL* ในคลอโรพลาสต์

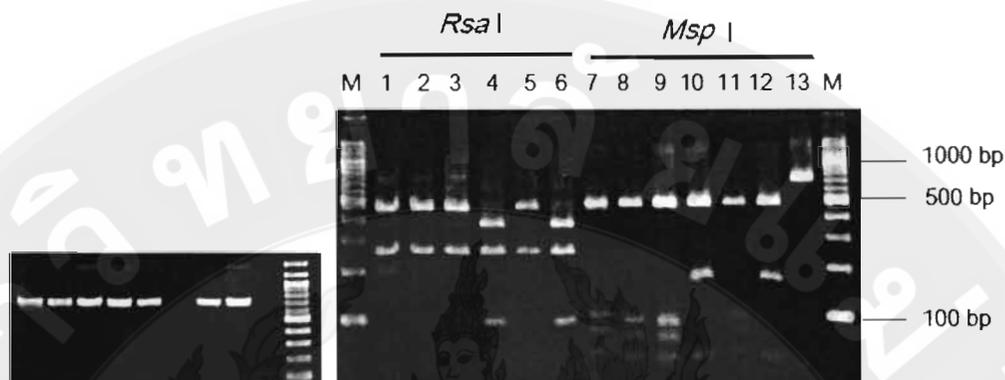
ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ ITS ของยีน ribosomal RNA โดยใช้ universal primers ได้แก่ “ITS5” forward primer 5'GAAGG-TGAAGTCGTAACAAGG3' และ “ITS4” reverse primer 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' ซึ่งผลิตผลจากปฏิกิริยาน่าจะคร่อมลำดับบริเวณ ITS 1, 5.8S rDNA, และ ITS2 พบว่าบริเวณลำดับเบสที่เป็น internal transcribed spacers (ITS) ใน ribosomal RNA genes ของพืชบางชนิดในสกุล *Dalbergia* รวมทั้งไม้พะยูนมีความยาวเท่ากันประมาณ 750 คู่เบส



ภาพที่ 27 ไดอะแกรมแสดงบริเวณ internal transcribed spacers (ITS) ที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยไพรเมอร์คู่ ITS4 และ ITS 5

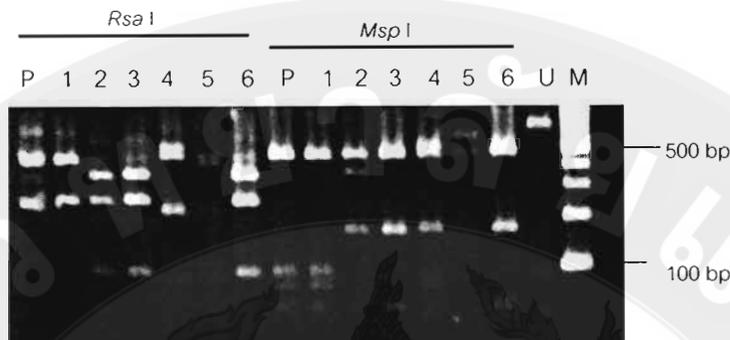


ภาพที่ 28 ผลจากปฏิกิริยา polymerase chain reaction บริเวณ internal transcribed spacers ของ rRNA genes จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเปลือกไม้เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนของไม้สกุล *Dalbergia* ช่องที่ 1,6 negative control ช่อง 2, 3 และ 4 เปลือกไม้พะยูนต่างต้น ช่อง 5 เปลือกไม้ปีพง (*D. cana* Grah.) ช่อง 7, 8 และ 9 ใบอ่อนจากพะยูนต่างต้น



ภาพที่ 29 Amplified ITS บริเวณ ribosomal RNA genes ขนาดประมาณ 750 คู่เบสจากเปลือกไม้สกุลเก็ด 7 ตัวอย่าง (ซ้าย) และ (ขวา) ผลจากการย่อย amplified ITS ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สามารถจำแนกไม้พะยุงจากไม้ปืง ช่อง 1-6 ย่อยด้วย *Rsa* I ช่อง 7-12 ย่อยด้วย *Msp* I ช่อง 1 กับ 7 มาจากต้นเดียวกัน เช่นเดียวกับ 2 กับ 8 และ 3, 5, 9 กับ 11 ช่อง 4, 6, 10 และ 12 เป็นไม้ปืงต้นเดียวกัน ช่อง 13 เป็น ITS จากต้นที่ 1 ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ M เป็น 100 bp marker

จากการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) ของ rRNA genes ปรากฏว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเปลือกไม้ให้ผลต่ำกว่าผลของปฏิกิริยาจากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนของไม้สกุล *Dalbergia* ดังในภาพที่ 28 แต่ทั้งนี้การทดลองได้แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเปลือกของต้นไม้เนื้อแข็งโดยวิธีการดัดแปลงที่ใช้สาร CTAB สามารถนำไปใช้ใน polymerase chain reaction เพื่อสังเคราะห์บริเวณลำดับเบส ITS แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือที่เรียกว่าเทคนิค PCR-RFLP วิธีนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาพันธุกรรมของไม้เนื้อแข็งต่อไป เพราะการเก็บตัวอย่างค่อนข้างง่ายและสะดวก ผลจากการทดลองครั้งนี้สามารถจำแนกไม้พะยุง *D. cochinchinensis* จาก ไม้ปืง *D. cana* ภาพที่ 29 จึงใช้วิธีการเดียวกันกับดีเอ็นเอที่สกัดจากเปลือกต้นชิงชัน เก็ดแดง เก็ดดำ ปืงเขาควย และปืง พบว่า เอนไซม์ 2 ชนิดสามารถจำแนกไม้พะยุงออกจากไม้สกุลเก็ดอื่นๆได้ ภาพที่ 30

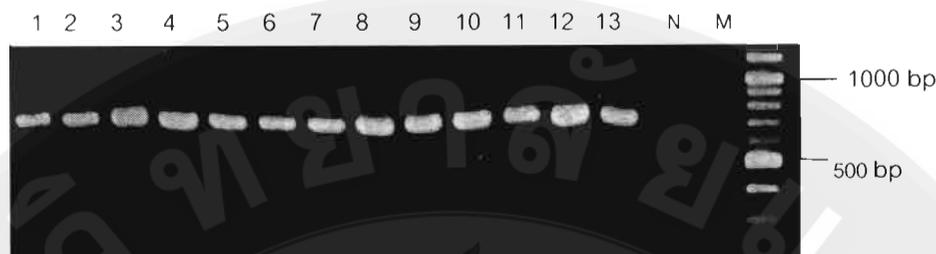


ภาพที่ 30 ผลจาก ITS PCR-RFLP ดีเอ็นเอเปลือกต้นไม้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I และ *Msp* I ช่อง P คือ positive control พะยุง; ช่อง 1 พะยุงอีกต้น; ช่อง 2 ชิงชัน; ช่อง 3 เกิดแดง; ช่อง 4 เกิดดำ; ช่อง 5 ปี่เขาควาย และช่อง 6 ปี่พง; U คือ ITS 750 bp; M คือ 100 bp marker

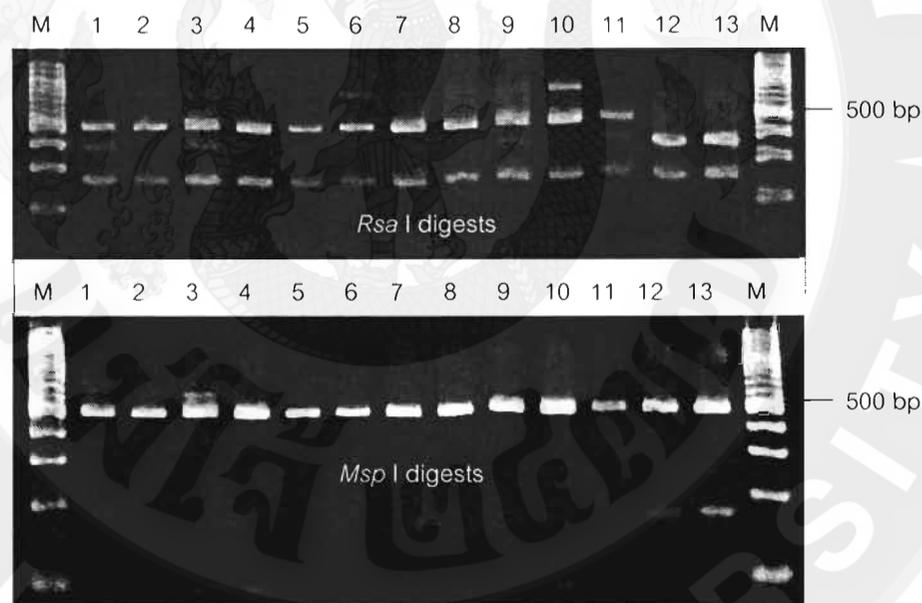
ผลจากการทำ ITS-RFLP ภาพที่ 30 คือ เอนไซม์ *Rsa* I สามารถจำแนก พะยุง (P, 1) ออกจากกลุ่มของ ชิงชัน, เกิดแดง, ปี่พง (2, 3, 6) ซึ่งแยกจากเกิดดำ (4) ซึ่งแยกจาก เกิดเขาควาย (5) ส่วนเอนไซม์ *Msp* I สามารถจำแนกไม้แต่ละชนิด ทั้ง 5 ชนิด คือ พะยุง (P, 1) ออกจาก ชิงชัน (2) ซึ่งต่างจาก เกิดแดง เกิดดำ เกิดเขาควาย ปี่พง สรุปว่า การตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดสามารถแยกไม้พะยุง ออกจากไม้เกิดอื่นๆ โดยสกัดดีเอ็นเอจากด้านในของเปลือกลำต้นของไม้เหล่านี้

ผลจากการทำ ITS-RFLP จากใบอ่อนของไม้พะยุงจากต่างถิ่น รวม 11 ตัวอย่าง จาก อ. โขงเจียม จ. อุบลราชธานี อ. บัวเขต จ. สุรินทร์ และบ้านคุง จ. อุดรธานี พบว่า เหมือนกันทั้งขนาดของ ITS (ประมาณ 750 คู่เบส) และลายแถบดีเอ็นเอ ภาพที่ 31 และ 32 แต่ผลจากใบชิงชันและเปลือกปี่พงยังคงให้ลายแถบที่แตกต่างจากไม้พะยุงในการทดลองคราวเดียวกัน (ตัวอย่างที่ 12 และ 13) แสดงว่าลำดับเบสบริเวณ ITS ของไม้พะยุงมีจุดที่ต่างจากไม้ชิงชันและไม้ปี่พง ส่วนดีเอ็นเอจากฝักแห้งของไม้พะยุงจากบ้าน โนนเรือ จ. ศรีสะเกษ ไม่เกิด ITS amplification

หลังจากที่ย่อย ITS products ด้วยเอนไซม์ *Rsa* I ไม้พะยุงจากแหล่งต่างๆ ให้ ชิ้นย่อยดีเอ็นเอรูปแบบเดียวกันกัน ซึ่งแตกต่างจากชิงชันและปี่พง พะยุงได้ชิ้นขนาด 500 และ 250 bp ชิงชันและปี่ได้ 350 และ 250 และ 100 bp หลังจากที่ย่อย ITS products ด้วยเอนไซม์ *Msp* I ไม้พะยุงจากแหล่งต่างๆ ให้ชิ้นดีเอ็นเอเหมือนกัน คือ ขนาด 500 bp และ 100 bp และชิ้นเล็กๆอีก ซึ่งแตกต่างจากชิงชันและปี่พงที่ถูกย่อยเป็นชิ้น 500 bp และชิ้น 180 bp

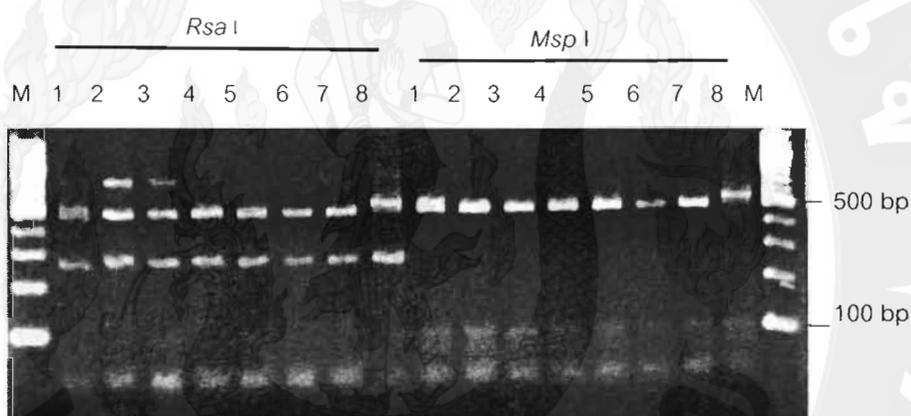


ภาพที่ 31 ชิ้นดีเอ็นเอ ITS ของใบอ่อนของไม้สกุลเกิด 13 ตัวอย่าง: 1,2 พะยูงจาก โขงเจียม จ.อุบลราชธานี; 3,4 พะยูงจากบัวเขต จ. สุรินทร์; 5,6 พะยูงจากบัวชุม จ. สุรินทร์; 7,8 พะยูงจากบ้านดุง จ. อุดรธานี; 9,10 จาก ห้วยไจ้ แม่โจ้; 11 จากบ้านดุง จ. อุดรธานี; 12 ชิงชัน (*D. oliveri*); 13 ปี่พวง (*D. cana*); N negative control; M 100 bp marker



ภาพที่ 32 ผล PCR-RFLP จากการย่อยชิ้น ITS ยาว 750 คู่เบสของ 13 ตัวอย่างด้วยเอนไซม์ *Rsa* I (บน) และ *Msp* I (ล่าง) 1,2 พะยูงจากอุบล 3,4 พะยูงจากบัวเขต สุรินทร์ 5,6 พะยูงจากบัวชุม จ. 7,8 พะยูงจากอุดรธานี 9,10 จาก ห้วยไจ้ แม่โจ้ 11 จาก อุดรธานี 12 ชิงชัน (*D. oliveri*) 13 ปี่พวง (*D. cana*) M 100 bp marker ดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ 1 - 11 สกัดจากใบดีเอ็นเอของชิงชันและปี่พวงได้จากเปลือกของลำต้น

ดีเอ็นเอที่สกัดจากเปลือกของลำต้นและใบสามารถใช้ในการระบุชนิดของไม้เนื้อแข็งได้ ภายใตยดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี PCR-RFLP ซึ่งเป็นผลจากการย่อยชิ้น ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I และ *Msp* I ใช้ในการจำแนกไม้ในสกุลเดียวกัน ความสำเร็จขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมดีเอ็นเอให้ได้คุณภาพของดีเอ็นเอและความเข้มข้นที่เหมาะสม ผู้วิจัยพบว่าดีเอ็นเอจากฝักแห้งไม่ประสบความสำเร็จ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากอายุของฝักแห้งที่เก็บมาตามฤดูและการมีสารเจือปนในดีเอ็นเอที่สกัดได้น้อยกว่าใบและเนื้อเยื่อจากเปลือก ภาพที่ 33 เป็นผลการทำ ITS-PCR-RFLP จำ เพื่อยืนยันวิธีการที่ใช้วิเคราะห์พันธุกรรมของไม้พะยุงได้



ภาพที่ 33 ผล PCR-RFLP โดยการย่อย ITS ขนาด 750 bp ของดีเอ็นเอสกัดจากใบของไม้พะยุง 8 ตัวอย่างด้วยเอนไซม์ *Rsa* I และ *Msp* I ช่อง 2,3 พะยุงจากจ. อุบลราชธานี 4,5,6,7,8 พะยุงจากจ. สุรินทร์

การใช้ไพรเมอร์คู่สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเทคนิค RAPD เป็นวิธีที่ดีเนื่องจากมีโอกาสพบลำดับเบสที่แตกต่าง ไพรเมอร์ที่ใช้ ได้แก่ OPL 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 และ 14 (Kit OPL, Operon) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ นลินี และ อุทัย (2549) เคยรายงานว่าได้ผลกับใบอ่อนของไม้ชิงชันที่เพาะเลี้ยงในหลอด แต่ในครั้งนี้นี้มีเพียง OPL-05: 5' ACGCAGGCAC 3' เท่านั้นที่ให้ผลดี แม้จะไม่สม่ำเสมอ ปัจจัยที่น่าจะมีผลต่อพีซีอาร์มีหลายประการ เช่น ความเข้มข้นของดีเอ็นเอและการละลายอย่างทั่วถึง ความบริสุทธิ์ของตัวอย่าง และโปรแกรม PCR ที่ใช้ นอกจากนี้เนื้อเยื่อของตัวอย่างที่ใช้ เช่น ดีเอ็นเอจากใบแก่หรือใบอ่อน อายุของลำต้นที่ใช้เปลือกมาสกัดดีเอ็นเอ ย่อมมีผลต่อปริมาณสารอื่นๆ ที่จะมีผลต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และที่สำคัญคือ ลำดับเบสที่สังเคราะห์อาจมีจำนวนไม่มาก ทำให้เอนไซม์และไพรเมอร์เข้าจับยากกว่า



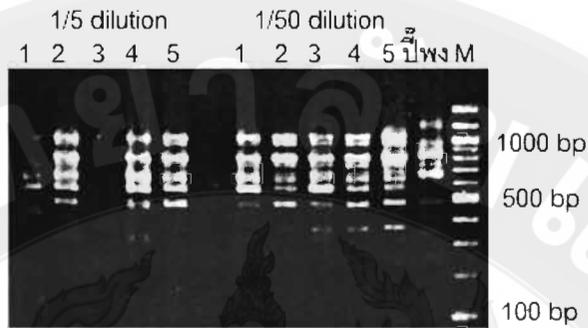
ภาพที่ 34 ผลจาก RAPD ใบที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5; 1 ตัวอย่างจากใบพะยูนจากต้นหลังตีกำจรต้นที่ 1 เจือจางที่ 1/100 ; 2 ตัวอย่างเดียวกัน เจือจางที่ 1/50; ทั้ง 2 ตัวอย่างย่อยด้วย *HaeIII* ก่อนทำ PCR โดยรอบ PCR คือ 94-46-72° ซ เป็นเวลา 30-30-45 วินาที รวม 35 รอบ ได้ผล PCR 1 แถบขนาดใกล้เคียงกับ 500 bp แถบชัดเจนดี



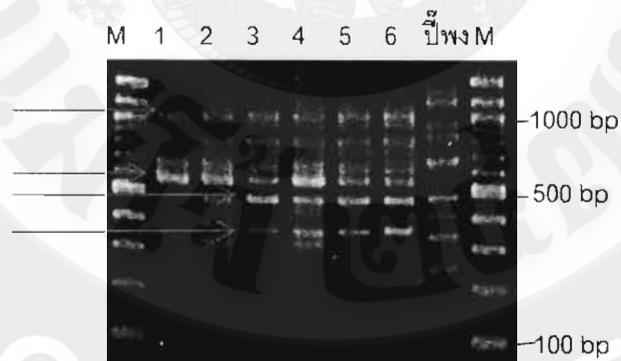
ภาพที่ 35 ผลจาก ใบใช้ไพรเมอร์ OPL5; 1, 2,3 เป็นตัวอย่างจากใบพะยูนต่างต้นที่มีแหล่งเดิมจาก จ.อุบลราชธานี เจือจาง 1/50 ; 4,5 และ 6 เป็นตัวอย่างสกัดจากเปลือกลำต้น เจือจาง 1/15; 7,8 เป็นผลจากใบของพะยูนต้นเดียวกันที่เดิมมาจากจ. สุรินทร์ เจือจาง 1/50; รอบของปฏิกิริยา PCR 94-46-72° ซ เป็นเวลา 30-30-45 วินาที รวม 35 รอบ ได้ลายแถบไม่ชัด โดยเฉพาะเปลือก



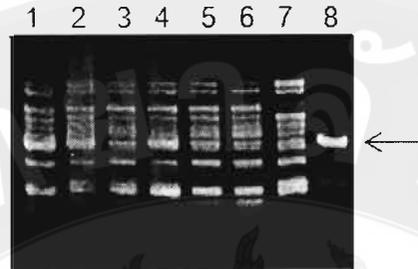
ภาพที่ 36 ผลจาก RAPD ฝักและเปลือกที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5; 1 ฝักพะยูนจากอ. บัวเขต จ. สุรินทร์; 2 ฝักพะยูนจากอ. โนนเรือ จ.ศรีสะเกษ; 3 ฝักแห้งจากอ.บัวจูนจจ.สุรินทร์ ; 4 เปลือกต้นพะยูน หลังตีกำจรไปโอเทคต้นที่ 3; 5 เปลือกเกิดแดงหน้าฟาร์มมหาวิทยาลัย ; 6 ใบจากพะยูนต้นที่ 1 หลังตีกำจรฯ ดีเอ็นเอทุกตัวอย่างย่อยด้วย *Hae III* ก่อนทำ PCR โปรแกรม 94-55-72° ซ เป็นเวลา 30-30-60 วินาที รวม 55 รอบ ลายแถบเพิ่มขึ้น ชัดเจน จำแนกพะยูนจาก เกิดแดง ฝักจากศรีสะเกษแตกต่างที่ 1000 bp



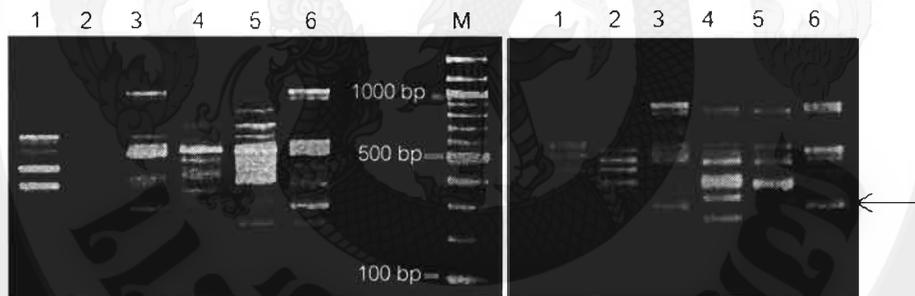
ภาพที่ 37 เปรียบเทียบผลจากการเตรียมดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เจือจาง 1/5 และ 1/50 ในเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPL5; 1, 2, 3, 4, 5 โบจากพะยุง 5 ต้นที่เดิมมาจาก อ.โจงเจียม จ. อุบลราชธานี ปีพงจะให้ลายแถบแตกต่างจากพะยุง รอบของ PCR 94-55-72 °ซ เป็นเวลา 30-30-60 วินาที รวม 55 รอบ ได้ลายแถบหลายตำแหน่ง แต่ยังไม่ปรากฏแถบเดิมในภาพที่ 36 ซึ่งมีขนาดประมาณ 500 bp



ภาพที่ 38 ผลจากการทำซ้ำ PCR โบที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5 กับโบอ่อนของพะยุง 6 ต้น ซึ่งมีแหล่งเดิมที่ อ.โจงเจียม จ. อุบลราชธานี ใช้ดีเอ็นเอเจือจาง 1/50 เทียบกับปีพง เมื่อใช้โปรแกรม PCR 55 รอบและ reannealing ที่ 55 °ซ ลายแถบเฉพาะของพะยุงมี 4 แถบที่จำแนกพะยุงออกจากปีพง



ภาพที่ 39 ผล RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5; 1- 6 เป็นตัวอย่างจากใบพะยูนต่างต้นที่มีแหล่งเดิมจาก จ.อุบลราชธานี เจือจาง 1/50 ; 7,8 เป็นผลที่ไม่คงที่ จากใบของพะยูนต้นเดียวกันที่เดิมมาจาก จ.สุรินทร์ เจือจาง 1/50 ใช้โปรแกรม PCR 55 รอบและ reannealing ที่ 55 °ซ แถบขนาดเกิน 500 bp ยังปรากฏในช่องที่ 7, 8



HaellI- digested template DNA

ภาพที่ 40 ผล RAPD จากเปลือกต้นไม้สกุลเถา ที่ใช้ไพรเมอร์ OPL5; 1 - 6 คือ พะยูน ชิงชัน เกิดแดง เกิดดำ เกิดเขาควาย และปี่พง ตามลำดับ ความเข้มข้นที่สกัดดีเอ็นเอในภาพที่ 22 ตัวอย่างย่อย *Hae* III (ซ้าย) ตัวอย่างไม่ได้ย่อยเอนไซม์ แต่เจือจาง 1/15 (ขวา) ใช้โปรแกรม PCR 55 รอบและ reannealing ที่ 55 °ซ ตัวอย่างชิงชันที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hae* III ไม่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ขึ้นขนาดสั้นกว่า 300 bp (ลูกศรชี้) น่าจะเป็นเครื่องหมายจำเพาะของชิงชัน เกิดแดง และปี่พง

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในยีน *rbcL* ของคลอโรพลาสต์ โดยใช้ universal primers ในโปรแกรมพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ reannealing 55° ซ 55 รอบ ปรากฏว่า ได้ amplified PCR product ขนาดประมาณ 1400 bp เหมือนกันทุกตัวอย่างทั้งไม้พะยุงและไม้สกุลเกิดอื่น (ชิงชันและปื๊อง) ภาพที่ 41 เมื่อทำ PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *AluI*, *RsaI* และ *MspI* ไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างไม้พะยุงหรือไม้ชิงชันในการศึกษาครั้งนี้ และพบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้วิเคราะห์ควรเป็นตัวอย่างจากใบ ส่วนฝักและเปลือกได้ผลน้อยหรือไม่ได้เลย



ภาพที่ 41 ผล PCR จาก chloroplast *rbcL* gene ของไม้พะยุง ขนาดประมาณ 1400 bp 1, 2 ใบอ่อนจากต้นที่ตึกกำจรฯ 2 ต้น เจือจาง 1/5; 3,4 ใบจากต้นปลูกในกระถาง อ.บัวเขต จ.สุรินทร์ เจือจาง 1/5; 5,6 ใบจากต้นปลูกในกระถาง บ้านบัวขุนจง จ.สุรินทร์ เจือจาง 1/5; 7,8 ฝักแห้งจากบ้านโนนเรือ จ.สุรินทร์ เจือจาง 1/5; 9,10 ใบจากต้นหลังตึกเทคโนโลยีชีวภาพ 2 ต้น เจือจาง 1/20; 11,12 ใบจากต้นที่ห้วยไผ่ ป่าบ้านโป่ง หลังมหาวิทยาลัย 2 ต้นเจือจาง 1/20 ; 13 ใบจากต้นที่หน้าเรือนกระจก เจือจาง 1/5; 14 เปลือกจากต้นปื๊อง; 15 ใบชิงชันไม้เจือจาง; M marker



ภาพที่ 42 ผลจากเทคนิค PCR-RFLP โดยการย่อย amplified *rbcL* 1400 bp ด้วยเอ็นไซม์ *Alu I* : 1,2 ใบอ่อนจากต้นที่ตึกกำจรฯ 2 ต้น ; 3,4 ใบจากต้นปลูกในกระถาง อ.บัวเขต จ.สุรินทร์ ; 5, 6 ใบจากต้นปลูกในกระถาง บ้านบัวขุนจง จ.สุรินทร์; 7, 8 ใบจากต้นหลังตึกเทคโนโลยีชีวภาพ 2 ต้น; 9,10 ใบจากต้นที่ห้วยโจ้ ป่าบ้านโป่ง หลังมหาวิทยาลัย 2 ต้น; 11 ใบจากต้นที่หน้าเรือนกระจก; 12 เปลือกจากต้นปีพง; 14 ใบชิงชัน; 15 ตัวอย่างใบชิงชันที่ไม่ได้ย่อยเอ็นไซม์; M marker



ภาพที่ 43 ผลจากเทคนิค PCR-RFLP โดยการย่อย amplified *rbcL* 1400 bp ด้วยเอ็นไซม์ *Rsa I* และ *Msp I* : 1 ใบอ่อนจากต้นที่ตึกกำจรฯ; 2, 3 ใบจากต้นปลูกในกระถาง อ.บัวเขต จ.สุรินทร์ ; 4 ใบจากต้นปลูกในกระถาง บ้านบัวขุนจง จ. สุรินทร์; 5 ใบจากต้นที่ห้วยโจ้ ป่าบ้านโป่ง หลังมหาวิทยาลัย ; 6 ใบชิงชัน; M marker ให้ผลเหมือนกันทุกตัวอย่าง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาพันธุกรรมของไม้พะยูนหลายด้าน ทั้งระดับโครโมโซมและอณูพันธุศาสตร์ เนื่องจากมีข้อจำกัดด้านงบประมาณและเวลาจึงได้ผลการวิจัยที่ไม่ละเอียด แต่เป็นพื้นฐานให้นักวิจัยอื่นสามารถนำไปต่อยอด ตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นได้มาจากการปลูก คือ ไม้ได้เก็บจากป่าธรรมชาติ แม้แต่เมล็ดที่ได้จากจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ อุบลราชธานี สุรินทร์ อุรธานี ศรีสะเกษ ต่างก็ได้มาจากต้นที่นำมาปลูกในท้องถิ่น ดังนั้นงานด้านการศึกษาพันธุกรรมของไม้พะยูนในธรรมชาติยังต้องริเริ่มก่อนที่จะสายเกินไป ผลงานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานในแง่วิธีการต่างๆ ได้แก่การศึกษาโครโมโซม การสกัดดีเอ็นเอ และความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับปรุงอีก

เทคนิคการศึกษาโครโมโซมจำเป็นต้องใช้การแยก โปรโตพลาสต์ด้วยส่วนผสมเอนไซม์ที่เหมาะสม เพื่อจะได้เห็นโครโมโซมซึ่งมีขนาดเล็ก การ pretreat ด้วย hypotonic KCl เป็นระยะเวลาพอดีจะช่วยการศึกษาสัณฐานของโครโมโซมแต่ละแท่ง เพื่อให้ได้ลารีไทป์ที่ดี งานด้าน molecular cytogenetics โดยเฉพาะ FISH จะช่วยในการค้นหาตำแหน่งของยีนที่สำคัญต่างๆ การหาความแตกต่างในไม้พะยูน ระดับโครโมโซมอาจจะทำได้ยากเนื่องจากขนาดเล็ก งานวิเคราะห์รูปแบบของดีเอ็นเอ น่าจะเป็นแนวทางที่ดีกว่า หากมีงบประมาณเพียงพอสามารถทำ cloning และ DNA sequencing และหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ Álvarez และ Wendel (2003) เสนอว่าให้ศึกษายีนที่เป็น single copy หรือ low-copy ในนิวเคลียสดีกว่า ribosomal DNA ที่มีหลาย copies ที่เป็น multigene family การศึกษา ITS-PCR อาจให้ข้อมูลผิดพลาดได้เพราะตั้งอยู่บนสมมุติฐานว่ามีความเหมือนกันทุกชุด ทั้งๆที่อาจจะมี nucleotide polymorphism เช่น indels และ pseudogenes ปนอยู่ การใช้ยีนจากคลอโรพลาสต์ เช่น *rbcL* ก็เป็นข้อมูลจากแม่ฝ่ายเดียว ดังนั้นจึงควรพัฒนา nuclear molecular markers ของยีนเดี่ยวมากกว่า

การศึกษาระดับดีเอ็นเอจำเป็นต้องได้ดีเอ็นเอคุณภาพดีมาก การสกัดดีเอ็นเอจากไม้พะยูนมีปัญหาเรื่องการเก็บตัวอย่างเพราะเป็นต้นไม้สูง การเก็บใบอ่อนขึ้นกับฤดูกาล นอกจากนี้จำนวนต้นไม้ในธรรมชาติเหลือน้อยจากขบวนการลักลอบตัดไม้ และไม่มีนโยบายการปลูกทดแทนจากรัฐบาล แต่งานวิจัยนี้แสดงว่าผู้วิจัยสามารถใช้ดีเอ็นเอสกัดจากเปลือกที่เจาะจากโคนลำต้นได้ และบางกรณีได้จากฝักที่ยังไม่แก่ แม้ว่าดีเอ็นเอจะมีสารปนเปื้อนมาก ดีเอ็นเอที่สกัดจากเปลือกและฝักจะไม่ยาวมาก แต่สามารถใช้ในเทคนิค PCR-based เช่น RFLP และ RAPD

สรุปผล (Summary)

การศึกษาโครโมโซมไม้พะยูนโดยวิธีแยกโปรโตพลาสต์ของเนื้อเยื่อปลายรากและยอดใบแล้วย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa หรือ DAPI สามารถระบุจำนวนโครโมโซมของพะยูน $2n = 20$ หรือ 10 คู่ เช่นเดียวกับไม้สกุลเกิด (*Dalbergia*) อื่นๆ การสกัดดีเอ็นเอนั้นอาจจะใช้เนื้อเยื่อด้านในของเปลือกลำต้นแทนใบได้ แม้ว่าจะได้สารอื่นเจือปนบ้าง ดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถนำไปใช้ในเทคนิควิเคราะห์ PCR products เช่น RAPD และ PCR-RFLP ผลการวิจัยครั้งนี้พบความแตกต่างระหว่างไม้พะยูนกับไม้สกุลเกิดอื่นในลำดับเบสของ ITS ซึ่งอยู่ใน ribosomal DNA ซึ่งจำแนกไม้พะยูนจากไม้สกุลเกิดอื่นได้ แต่ไม่พบความแตกต่างภายในตัวอย่างไม้พะยูนที่มาจากแหล่งต่างๆ จากเทคนิค RAPD ด้วยไพรมอร์เดียวพบหลายแถบของไม้พะยูนที่อาจใช้เป็นเครื่องหมายได้ แต่การวิเคราะห์ลำดับเบส *rbcL* gene ในคลอโรพลาสต์ด้วยเอนไซม์ *AluI*, *RsaI* และ *MspI* พบว่าไม้พะยูนจากต่างถิ่นเหมือนกันและเหมือนกับไม้ชิงชัน

เอกสารอ้างอิง

- นลินี รุ่งเรืองศรี และ อุทัย รุ่งเรืองศรี. 2549. การแข่งขันไม้ป่าเนื้อแข็งเพื่อการอนุรักษ์. รายงานผลการวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.
- สุจิตรา จางตระกูล. 2540. เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ในการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์กรรมไม้ป่า. สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 10 เรื่อง พันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมไทย. กรุงเทพมหานคร, 19-21 มีนาคม : 39-47.
- หนังสือพิมพ์ไทยรัฐออนไลน์. ข่าวหน้า 1 ระคมตำรวจ 1,500 จับลอบตัดไม้พะยูน. ปีที่ 59 ฉบับที่ 18438. วันที่ 15 กรกฎาคม 2551. จาก <http://www.thai.rath.co.th>
- เอกสารส่งเสริมการปลูกป่า กองบำรุง กรมป่าไม้. ต้นไม้ที่น่าสนใจ. สำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 1 (ปราจีนบุรี) จาก <http://www.dnp.go.th/mfcd3/interesttrees.htm> [10 สิงหาคม 2554]
- Álvarez, I. and J.F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 417-434.
- Anamthawat-Jónsson, K. 2001. Molecular Cytogenetics of Introgressive Hybridization in Plants. *Methods in Cell Sci.* 23 : 139-148.

- Anamthawat-Jónsson, K. 2003. Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and *in situ* hybridization. **Methods in Cell Sci.** 25 : 91-95.
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. **Mol. Phylogenet. Evol.** 1: 3-16.
- Baldwin, B.G. 1993. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) base on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: Chromosomal and morphological evolution reexamined. **Am. J. Bot.** 80: 222-238.
- Chokchaichamnankit, P., K. Anamthawat-Jónsson and W. Chulalaksananukul. 2008. Chromosomal mapping of 18S-25S and 5s ribosomal genes on 15 species of Fagaceae from Northern Thailand. **Silvae Genet.** 57 (1): 5-13.
- Chowdappa, P., D. Brayford, J. Smith and J. Flood. 2003. Identification of *Phytophthora* species affecting plantation crops by RFLP of PCR-amplified internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. **Current Sci.** 85:34-36.
- Colpaert N., S. Cavers, E. Bandou, H. Caron, G. Gheysen and A. Lowe. 2005. Sampling tissue for DNA analysis of trees: trunk cambium as an alternative to canopy leaves. **Silvae Genet.** 54: 265-269.
- Doležal, J., Doležalová, M., Roux, N., and I. Van denhouwe. 1998. A novel method to prepare slides for high resolution chromosome studies in *Musa* spp. **InfoMusa** 7: 3-4.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bull.** 19: 11-15.
- Fukui, K. and S. Nakayama (eds.). 1996. **Plant Chromosomes: Laboratory Methods.** Boca Roton: CRC Press. 274 p.
- Hircmath, S.C. and M. H. Nagasampige. 2004. Genetic relationships among some species of *Dalbergia* using PCR-based DNA markers. **Cytologia** 69(2): 125-130.
- Juchum, F.S., J.B. Leal, M. Santos, M.P. Almeida, D. Ahnert and R.X. Corrêa. 2007. Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) using RAPD markers. **Genet. Mol. Res.** 6(3): 543-553.

- Novaes, R., J. Rodrigues J. and M. Lovato. 2009. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. **Genet. Mol. Res.** 8: 86-96.
- Prawirohatmodjo S., J. Suranto, A. Martawijaya, R.W. den Outer and M.S.M. Sosef. 1994. *Dalbergia L.f.* **In: Plant Resources of South-East Asia 5 (1) Timber trees: Major commercial timbers.** PROSEA: Bogor. pp.155-161.
- Singh, Ram J. 1993. **Plant Cytogenetics.** Boca Raton: CRC Press. 391 p.
- Soonhuae, P., C. Piewluang and T. Boyle. 1994. Population genetics of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre and implications for genetic conservation. **ASEAN Forest Tree Seed Centre Project.** Technical Publication no.18.
- Sumantakul, V. 2003. Status of forest genetic resources conservation and management in Thailand in forest genetic resources conservation and management. **Proceedings of the Asia Pacific Forest Genetic Resources Programme (APFORGEN) Inception Workshop.** Kepong, Kuala Lumpur, Malaysia, July 15-18, 2003: 265-289.
- Welsh, J., D. Ralph and M. McClelland. 1995. DNA and RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR. **In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H. & Sninsky, J.J. (Eds.): PCR Strategies.** Academic Press. San Diego. pp.249-276.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers as useful genetic markers. **Nuc. Acid Res.** 18: 6531-6535.



ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าจำนวนใบของต้นพยูง เมื่อเลี้ยงได้ 10 วัน

Source of variance	DF	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	2	0.13	0.07	0.17 ^{ns}	0.84
Error	12	4.80	0.40		
Total	14	4.93			

C.V. = 30.60%

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าจำนวนใบของต้นพยูง เมื่อเลี้ยงได้ 20 วัน

Source of variance	DF	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	2	0.13	0.07	0.06 ^{ns}	0.94
Error	12	13.60	1.13		
Total	14	13.73			

C.V. = 27.53%

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าจำนวนใบของต้นพยูง เมื่อเลี้ยงได้ 30 วัน

Source of variance	DF	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	2	0.93	0.47	0.34 ^{ns}	0.71
Error	12	16.40	1.37		
Total	14	17.33			

C.V. = 26.98%

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าจำนวนข้อของต้นพยูง เมื่อเลี้ยงได้ 10 วัน

Source of variance	DF	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	2	0.13	0.07	0.22 ^{ns}	0.80
Error	12	3.60	0.30		
Total	14	3.73			

C.V. = 37.34%

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าจำนวนข้อของต้นพยูง เมื่อเลี้ยงได้ 20 วัน

Source of variance	DF	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	2	1.60	0.80	0.80 ^{ns}	0.47
Error	12	12.00	1.00		
Total	14	13.60			

C.V. = 29.41%

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าจำนวนข้อของต้นพยูง เมื่อเลี้ยงได้ 30 วัน

Source of variance	DF	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	2	1.73	0.87	0.60 ^{ns}	0.56
Error	12	17.20	1.43		
Total	14	18.93			

C.V. = 30.43%

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าความสูงของต้นพยูง เมื่อเลี้ยงได้ 10 วัน

Source of variance	DF	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	2	0.70	0.35	0.37 ^{ns}	0.69
Error	12	11.20	0.93		
Total	14	11.90			

C.V. = 20.13%

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าความสูงของต้นพยูง เมื่อเลี้ยงได้ 20 วัน

Source of variance	DF	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	2	5.03	2.52	0.64 ^{ns}	0.54
Error	12	46.90	3.91		
Total	14	51.93			

C.V. = 29.41%

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าความสูงของต้นพยูง เมื่อเลี้ยงได้ 30 วัน

Source of variance	DF	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	2	5.20	2.60	0.34 ^{ns}	0.72
Error	12	92.30	7.69		
Total	14	97.50			

C.V. = 36.98%

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณสารเคมีในอาหารเลี้ยงเนื้อเชื้อพิษสุตร MS และ WPM (หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร)

ชนิดสารเคมี	MS	WPM
NH_4NO_3	1650	400
KNO_3	1900	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	-
KH_2PO_4	170	170
CaCl_2	440	72.5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	471.26
MgSO_4	-	180.54
K_2SO_4	-	990
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6
H_3BO_3	6.2	6.2
KI	0.83	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	-
FeNaEDTA	37.3	36.7
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	-
Myo-inositol	100	100
Nicotinic acid	0.5	0.5
Pyridoxine	1	0.5
Thiamine	2	0.1
Glycine	-	2.0